



# Brevet d'invention

Certificat d'utilité

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 JAN. 2008

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 07/ 210502

REMISE DES PIÈCES DATE LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		Réservé à l'INPI 03 08 06 4 <b>INPI PARIS</b> - 2 JUIL. 2003		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> CABINET ORES 36 rue de St Pétersbourg 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) BLOcp644/107FR					
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>			<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie		
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>			<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>		
Demande de brevet			<input checked="" type="checkbox"/>		
Demande de certificat d'utilité			<input type="checkbox"/>		
Demande divisionnaire			<input type="checkbox"/>		
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale			N°		Date
			N°		Date
Transformation d'une demande de brevet européen			<input type="checkbox"/>		Date
Demande de brevet initiale			N°		Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> UTILISATION DES N-ALKANOLS COMME ACTIVATEURS DU CANAL CFTR					
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>			Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>			<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique		
Nom ou dénomination sociale			CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
Prénoms					
Forme juridique			Etablissement public		
N° SIREN					
Code APE-NAF					
Domicile ou siège	Rue	3 rue Michel-Ange			
	Code postal et ville	75 017 94 PARIS Cedex 16			
	Pays	FRANCE			
Nationalité			française		
N° de téléphone (facultatif)			N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)					
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»					

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

**BR2**

REMISE DES PIÈCES DATE		Réservé à l'INPI 03 08064 INPI PARIS
LIEU		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		- 2 JUL. 2003

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>			
Nom	ORES		
Prénom	Béatrice		
Cabinet ou Société	CABINET ORES		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg	
	Code postal et ville	75 008 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)	01.53.21.11.00.		
N° de télécopie (facultatif)	01.53.21.08.88.		
Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

## UTILISATION DES N-ALKANOLS COMME ACTIVATEURS DU CANAL CFTR

La présente invention est relative à une nouvelle utilisation des n-alkanols comme activateurs du canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) et à l'application de ladite utilisation aux traitements des pathologies dans lesquelles on observe un dysfonctionnement dudit canal, telles que la mucoviscidose.

La protéine CFTR, localisée dans la région apicale des cellules épithéliales, est un canal chlorure contrôlé par le niveau d'AMPc et impliqué dans l'hydratation des fluides sécrétés par les glandes sous-muqueuses. Un dysfonctionnement de ce canal CFTR est responsable de la mucoviscidose, maladie génétique autosomique récessive.

Dans les cellules épithéliales, les transports d'eau et d'électrolytes sont associés à une augmentation des perméabilités membranaires pour les ions  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Cl^-$ . Ces mouvements d'eau et d'électrolytes sont liés à l'activité de protéines membranaires spécialisées (canaux ioniques, transporteurs) ayant une localisation précise dans la membrane plasmique de la cellule (pôle apical ou muqueux ; basolatéral ou séreux). Les techniques d'électrophysiologie moléculaire (patch-clamp) et de mesure de flux ioniques rendent possible l'étude des transports ioniques transépithéliaux, de leurs régulations et de leurs dérèglements pathologiques.

Un dysfonctionnement des cellules épithéliales et notamment celui des transports d'électrolytes est à l'origine de nombreuses physiopathologies, telle que la mucoviscidose ou fibrose kystique (*Cystic Fibrosis* (CF), dans la terminologie anglo-saxonne), qui est considérée comme une génopathie des glandes exocrines.

Le gène appelé CF impliqué dans la mucoviscidose a été identifié, cloné et localisé sur le bras long du chromosome 7 (Riordan et al., 1989). La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive la plus commune dans les populations caucasiennes. Aux Etats-Unis et dans la plupart des pays d'Europe, la fréquence des porteurs hétérozygotes du gène CF muté est de 1 sur 20 à 1 sur 30, ce qui représente une naissance d'un enfant malade sur 2500 à 3000 environ. Les progrès réalisés dans le domaine de la recherche médicale et biologique ont fait, depuis les années 60, considérablement progresser l'espérance de vie des patients atteints de

mucoviscidose, qui atteint aujourd'hui 30 ans environ. Le gène CF est constitué de 250.000 paires de bases définissant 27 exons et code pour la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), qui comporte 1480 acides aminés (Riordan et al., 1989). La mucoviscidose est une canalopathie, c'est-à-dire une pathologie liée à un dysfonctionnement de canaux ioniques, dans la mesure où la protéine CFTR a été caractérisée comme un canal chlorure. A l'heure actuelle, il a été déjà rapporté plus de 1300 mutations dans le gène CF, qui altèrent les propriétés et la fonction du canal CFTR.

La protéine CFTR est exprimée dans de nombreux organes dont le pancréas exocrine, les poumons, les glandes sudoripares, l'intestin, le tissu hépatique, l'appareil reproducteur, le rein et le tissu cardiaque.

L'intérêt porté à la mucoviscidose a eu des conséquences importantes pour la compréhension des mécanismes sécrétoires des cellules épithéliales normales. Les cellules épithéliales des glandes exocrines de différents organes, tels que l'intestin, le pancréas ou les poumons, contrôlent le transport de sel et d'eau dans les tissus. La protéine CFTR, qui est surtout localisée au pôle apical des cellules épithéliales, est un canal chlorure, de faible conductance, activé par la voie de l'AMPc.

La CFTR est impliquée dans l'hydratation des fluides sécrétés par les glandes sous-muqueuses et influencerait la sécrétion des mucines, glycoprotéines qui participent notamment à la formation du mucus bronchique.

Dans la mucoviscidose, le dysfonctionnement du canal CFTR affecte la sécrétion apicale d'ions Cl, activée par l'AMPc. Le transport électrolytique, devenu anormal, provoque l'épaississement du mucus extracellulaire et entraîne ainsi des obstructions au niveau des lumières des différents tissus. Ces obstructions sont la cause de bronchites chroniques dues à des infections bactériennes pulmonaires opportunistes, des insuffisances pancréatique et hépatique, d'une sécrétion sudoripare anormalement concentrée et de l'infertilité masculine.

La protéine CFTR est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 170 kD comportant cinq domaines (Riordan et al., 1989) : deux domaines transmembranaires avec chacun 6 segments transmembranaires ou hélices  $\alpha$  (numérotées de 1 à 12, comportant chacun de 21 à 22 acides aminés), deux domaines intracellulaires de

fixation des nucléotides (NBD1 et 2 pour *Nucleotide Binding Domain*) et un large domaine intracellulaire de régulation (domaine R).

La régulation de la CFTR a été particulièrement étudiée. Deux processus complexes contrôlent l'activité du canal CFTR : la phosphorylation du  
5 domaine R par des protéines kinases et la fixation et l'hydrolyse d'ATP sur les deux domaines NBD. La déphosphorylation du canal CFTR entraîne une perte d'activité du canal jusqu'à sa fermeture (Tabcharani et al., 1991 ; Becq et al., 1994).

Plusieurs études ont montré que la protéine CFTR a, en plus de son activité canal chlorure, de nombreuses autres fonctions cellulaires non encore éluci-  
10 dées. Elle régulerait d'autres canaux ioniques tels que le canal chlorure rectifiant sortant ORCC (Schwiebert et al., 1995), le canal sodium épithélial ENaC (Quinton et al., 1999) ou le canal chlorure dépendant du calcium CaCC (Wei et al., 1999). Elle aurait aussi une activité régulatrice sur la libération d'ATP de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (Schwiebert et al., 1995).

La CFTR partage une homologie de séquence et de structure, avec  
15 les transporteurs ABC (pour "ATP-binding cassette") qui constituent une grande famille de protéines membranaires très conservées dans l'évolution. Ces transporteurs sont impliqués dans la translocation de substrats variés à travers les membranes cellulaires. Cependant, alors que chez les procaryotes de nombreux couples transpor-  
20 teurs/substrats ont été définis, ces informations sont plus rares chez les eucaryotes. Chez les mammifères, on dénombre actuellement 48 transporteurs ABC dont les dysfonctionnements pourraient être associés à une pathologie. La glycoprotéine P (ou MDR pour *Multi Drug Resistance*) est impliquée dans le rejet de drogues cyto-  
25 toxiques. La CFTR contrôle le transport de chlorure transépithélial et l'hydratation des compartiments muqueux, alors qu'une des isoformes de la MDR serait plutôt impli-  
quée dans la translocation de la phosphatidylcholine.

Parmi les quelques 1300 mutations du gène CF recensées jusqu'à  
aujourd'hui et qui provoquent la mucoviscidose, la plus fréquemment retrouvée est une délétion de trois paires de bases dans une région codante (exon 10) du gène CF.  
30 Cette mutation correspond à la délétion, dans la protéine, d'une phénylalanine en position 508 ( $\Delta F508$ ) dans le domaine NBD1. La fréquence d'apparition de cette

mutation est de 70 % des allèles mutés en moyenne dans les analyses génétiques (Tsui et al., 1991) et 50% des patients sont homozygotes pour cette mutation. Les conséquences de cette mutation sont dramatiques car la protéine anormale issue de la transcription du gène muté ( $\Delta F508$ ) n'est plus capable d'assurer ses fonctions dans le transport de chlorure des cellules épithéliales affectées. L'absence de courant chlorure après stimulation des cellules épithéliales des glandes exocrines par l'AMPc est la principale caractéristique montrant la présence d'une anomalie sur le gène CF et notamment de la mutation ( $\Delta F508$ ). La densité de mutations la plus élevée se trouve dans les deux domaines de fixation des nucléotides (NBD1 et NBD2). Sept autres mutations importantes sont présentes avec des fréquences supérieures à 1 %. La mutation G551D correspond à la substitution d'un résidu glycine (G) en position 551 de la protéine par un acide aspartique (D). Les patients CF porteurs de ce mutant ont une pathologie sévère avec une insuffisance pancréatique et des troubles pulmonaires graves (Cutting et al., 1990). La fréquence d'observation de cette mutation atteint 3 à 5 % chez certaines populations de patients atteints de mucoviscidose. A l'inverse de la délétion  $\Delta F508$ , la protéine CFTR portant la mutation G551D est mature et est incorporée dans la membrane (Gregory et al., 1991). Cependant, la mutation entraîne une imperméabilité membranaire et la stimulation de la voie de l'AMPc n'ouvre pas le canal associé à l'expression de ce mutant (Gregory et al., 1991 ; Becq et al., 1994). D'autres mutations comme R117H, R334W et R347P apparaissent avec des fréquences basses de 0,8, 0,4 et 0,5% respectivement et sont associées à des pathologies moins sévères (Sheppard et al., 1993). Ces trois mutants expriment une protéine CFTR mature, glycosylée permettant son insertion dans la membrane. Cependant l'amplitude du courant, la conductance unitaire et la probabilité d'ouverture du canal, associées avec chacune des trois mutations, sont modifiées (Sheppard et al., 1993 ; Becq et al. 1994). La régulation par la voie de l'AMPc semble toutefois normale pour ces trois différents mutants, y compris pour  $\Delta F508$  (Becq et al., 1994).

Les porteurs hétérozygotes du gène CF, c'est-à-dire ayant une copie du gène normal et une copie du gène muté, sont généralement sains et représentent environ 5 % de la population caucasienne. Un avantage sélectif est suggéré pour expliquer le pourcentage relativement élevé de cette mutation à l'état hétérozygote au

cours de l'évolution. Les personnes hétérozygotes auraient été plus résistantes à des épidémies de fièvre typhoïde, de choléra, de tuberculose ou de diarrhées sécrétoires.

Cependant une corrélation entre porteurs hétérozygotes pour le gène CF et susceptibilité à développer des pathologies diverses, telles que l'asthme, des polyposes nasales, des sinusites et bronchites chroniques, des bronchiectasies, des aspergilloses bronchopulmonaires allergiques ou des pancréatites a été établie par certains travaux (Griesenbach et al., 1999). Des mutations survenant dans des régions flanquantes entre exons-introns du gène CF ont également été décrites. Par exemple, il existe des variants polymorphiques 9-, 7- ou 5- thymidines entre l'intron 8 et l'exon 9.

10 Le variant polymorphique 5T diminue la synthèse de la protéine CFTR, au demeurant normale. L'association du variant 5T sur un allèle avec une mutation de CFTR sur l'autre allèle conduit à une agénésie congénitale de canaux déférents (ACCD), se caractérisant chez le patient masculin par une infertilité sécrétoire sans aucun autre trouble classique de mucoviscidose. Une certaine proportion d'hommes stériles

15 pourrait en fait être porteurs de ces mutations dans le gène CF, sans développer la mucoviscidose proprement dite.

Cette découverte ouvre un débat sur le diagnostic et la classification de la mucoviscidose, lié aux désordres physiologiques répertoriés chez des individus hétérozygotes. On pourrait ainsi définir, à côté des cas de mucoviscidose classique,

20 des cas atypiques :

- Dans le cas classique, les patients homozygotes malades, (e.g.  $\Delta F508/\Delta F508$ ) ou hétérozygotes composites (e.g.  $\Delta F508/G551D$ ) présentent la majorité des troubles caractérisés par cette maladie.

- Dans les cas atypiques, les patients, hétérozygotes composites (25  $(\Delta F508/5T...)$  ou hétérozygotes vrais, montrent des troubles divers : ACCD, asthme, sinusites chroniques, etc..., tels que précisés ci-dessus.

Afin de pallier le déficit en protéines CFTR fonctionnelles, aussi bien dans les cas classiques de mucoviscidose que dans les cas atypiques marqués par différents troubles (asthme, bronchiectasies, sinusites...), il peut être envisagé d'activer

30 pharmacologiquement la protéine CFTR sauvage encore présente (hétérozygotes), et les mutants, tels que  $\Delta F508$  ou  $G551D$ , insérés dans la membrane, mais inactifs. Malgré un défaut d'adressage de la protéine  $\Delta F508$  dans les membranes de cellules



épithéliales affectées par la mucoviscidose, plusieurs groupes ont montré que cette protéine pouvait être fonctionnellement présente, en petit nombre, dans les membranes (Dalemans et al., 1991 ; Drumm et al., 1991 ; Becq et al., 1994).

Ainsi, l'utilisation d'activateurs du canal CFTR et notamment  
5 d'ouvriers du canal CFTR peut optimiser les chances de succès d'une pharmacothérapie des maladies liées à un dysfonctionnement du canal CFTR.

Malgré les progrès réalisés dans la génétique de la mucoviscidose et dans la biologie et la biochimie de la protéine CFTR, la pharmacologie des ouvriers du canal CFTR est peu développée.

10 Plusieurs études ont montré qu'en plus des agents généraux bien connus pour activer la protéine CFTR par la voie de l'AMPc, tels que la forskoline (FSK), il était possible d'utiliser d'autres molécules pour activer les canaux CFTR. Le mode d'action de ces activateurs est encore peu connu et leurs effets limités.

On peut citer les quelques familles de molécules aujourd'hui  
15 connues pour leurs propriétés d'activateurs ou d'ouvriers du canal CFTR :

- Les phénylimidazothiazoles (lévamisole et bromotétramisole) (Becq et al., 1994). Il a été montré que le lévamisole et le bromotétramisole permettent de contrôler l'activité et le niveau de phosphorylation du canal CFTR. Toutefois, ces molécules ne semblent pas pouvoir agir dans toutes les cellules. De plus, dans un  
20 modèle de souris transgéniques présentant la mutation G551D/GS51D, le bromotétramisole n'a pas eu l'effet activateur attendu.

- Les benzimidazolones (NS004) (Gribkoff et al., 1994). Ces composés, dérivés du noyau imidazole comme le lévamisole peuvent, dans certaines conditions, et notamment lorsque le canal CFTR a été phosphorylé, ouvrir le canal.  
25 Les benzimidazolones sont toutefois également activateurs de nombreux canaux potassium (Olesen et al., 1994) et sont, de ce fait, peu spécifiques du canal CFTR.

- Les xanthines substituées comme l'IBMX (3-isobutyl-1-méthyl-xanthine) ou la théophylline sont d'abord connus comme des inhibiteurs des phosphodiesterases intracellulaires (enzymes de dégradation de l'AMPc), de phosphatases  
30 ainsi que des antagonistes des récepteurs membranaires fixant l'adénosine ; elles agissent en outre sur la mobilisation du calcium intracellulaire. Indépendamment de ces propriétés ce sont des activateurs du canal CFTR (Chappe et al., 1998). Le méca-

nisme d'action des xanthines sur le CFTR est encore mal connu mais pourrait impliquer leur fixation sur les domaines de fixation des nucléotides (NBD1 et NBD2).

- Les benzo(c)quinolizinium (Demande internationale PCT WO 98/05642 ; Becq et al., 1999) qui sont davantage spécifiques du CFTR mais peuvent induire des effets indésirables ; en effet, ces molécules activent le canal CFTR par une voie indépendante de l'AMPc. Cependant, à l'heure actuelle, les tests de toxicité relative à cette famille de molécules n'ont pas encore été effectués et il n'est pas improbable que ces molécules puissent se révéler avoir des effets toxiques sur l'animal.

Ainsi, l'ensemble des traitements actuellement préconisés, soit manquent de spécificité, soit entraînent trop d'effets indésirables.

C'est pourquoi la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à des médicaments qui activent spécifiquement le canal chlorure CFTR, tout en ne modifiant pas le taux de base de l'AMPc, destinés au traitement de pathologies associées à des troubles des flux ioniques transmembranaires, notamment de chlorure, et notamment dans les cellules épithéliales chez l'homme ou l'animal.

La présente invention a plus particulièrement pour but de fournir de nouveaux médicaments susceptibles d'être utilisés dans le cadre du traitement de la mucoviscidose, des cas de "mucoviscidose atypiques" (asthme, sinusites chroniques, bronchectasies...), de la prévention ou du traitement des obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives (notamment pancréatique ou intestinale), de maladies cardio-vasculaires ou encore rénales.

Les Inventeurs ont en effet trouvé, de manière surprenante, que certains n-alkanols activent spécifiquement le canal chlorure CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). L'activité du canal CFTR est mesurée à l'aide de la technique d'efflux d'iodure radioactif ( $^{125}\text{I}$ ) ou de la technique de patch-clamp. L'ordre d'activation de CFTR par les n-alkanols est hexanol-1 < heptanol-1 < octanol-1 < octanol-2 < decanol-1 (1 mM).

La présente invention a, en conséquence, pour objet l'utilisation des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, ou cycliques en  $\text{C}_6$ - $\text{C}_{10}$ , pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies associées à des troubles des canaux chlorure CFTR (flux chlorures transmembranaires), notamment dans les cellules épithéliales, chez l'homme ou l'animal.

Le fait que les n-alkanols en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ne modifient pas le niveau d'AMPC des cellules est un avantage pour au moins deux raisons :

- cela est en faveur d'une spécificité d'interaction entre les n-alkanols et le canal CFTR

5 - cela permet d'éviter des effets secondaires et non spécifiques qui peuvent être induits par une augmentation d'AMPC dans les cellules.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, dans lesquels le groupe OH est en position 1 (alcool primaire) ou en position 2 (alcool  
10 secondaire).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées cycliques portant un ou plusieurs groupements alcool (cyclohexane, par exemple).

Les n-alkanols présentent, dans cette application, un certain nombre  
15 d'avantages :

- aucune activation par les n-alkanols n'est détectée dans des cellules CHO contrôles qui n'expriment pas de CFTR, alors que l'activation de CFTR par les n-alkanols dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) exprimant le canal CFTR est bloquée par l'ajout de glibenclamide (100 µM), utilisé pour bloquer spécifiquement le canal CFTR.  
20

- les n-alkanols ne modifient pas le niveau de base d'AMPC; les n-alkanols activent ainsi spécifiquement le canal CFTR par une voie indépendante de l'AMPC. L'activation du CFTR par les n-alkanols est indépendante de l'effet potentiel de ces molécules sur le découplage cellulaire.

25 - les n-alkanols agissent par un mécanisme indépendant de la protéine kinase C.

Parmi les n-alkanols, c'est surtout l'octanol qui a déjà été proposé dans de nombreuses applications :

1. comme molécules anesthésiques ; il exerce des effets complexes  
30 sur les membranes biologiques. Une théorie physico-chimique avait été avancée pour expliquer la puissance effectrice des anesthésiques. L'efficacité des anesthésiques augmenterait en fonction de leur solubilité dans les graisses et serait une fonction

linéaire du coefficient de partition octanol-eau (la loi de Meyer-Overton sur l'anesthésie). En fait les mécanismes impliqués dans les effets des n-alkanols ne sont pas élucidés. Cependant, deux hypothèses générales ont été proposées pour expliquer les effets des n-alkanols sur les protéines associées aux membranes biologiques :

5                   - La première suggère que les n-alkanols altèrent les propriétés physiques de la membrane, propriétés nécessaires au fonctionnement normal des protéines membranaires.

                  - La deuxième suggère que les n-alkanols se fixent directement dans des régions hydrophobes spécifiques des protéines (Mascia et al., 2000).

10               Il est probable que les deux mécanismes interviennent. Cependant, c'est actuellement la deuxième hypothèse qui retient l'intérêt, la première ayant été contredite par des expériences qui montrent que les perturbations de la fluidité membranaire, engendrées par les n-alkanols, étaient mimées par une augmentation de température corporelle (fièvre), sans pour autant observer les mêmes effets sur  
15 l'activité électrique.

                  Une caractéristique commune de l'action de ces molécules est la modulation du signal électrique qui est due à l'altération de la conductance membranaire par les canaux ioniques.

20               2. dans la régulation du récepteur-canal  $\text{Cl}^-$  au GABA (acide gamma-aminobutyrique) (Narahashi et al., 1998 ; Marszalec et al., 1994 ; Nakahiro et al., 1991). Ces récepteurs sont exprimés au niveau du système nerveux central.

                  3. comme broncho-dilatateurs : les n-alkanols interviennent dans la relaxation des muscles lisses des voies aériennes en diminuant notamment la concentration intracellulaire de calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Sakihara et al., 2002).

25               4. action au niveau des jonctions cellulaires en altérant la conductance des jonctions communicantes dans de nombreux tissus y compris le tissu épithélial (Weingart et al., 1998) ; cet effet concerne plus spécifiquement les agents lipophiles, tels que les n-alkanols à longue chaîne. Le mécanisme moléculaire résultant du découplage cellulaire demeure obscur.

30               5. Les alcools tel que l'octanol, comme agents anti-émulsifiants, ont déjà été utilisés, en aérosol, chez des patients souffrant d'oedèmes pulmonaires (Miller et al., 1973), mais leurs mécanismes d'action demeurent inconnus.

L'utilisation de certains n-alkanols, dans le traitement des pathologies associées à des troubles des flux ioniques transmembranaires de chlorure dans les cellules épithéliales et notamment de la mucoviscidose et des mucoviscidoses atypiques vient d'être trouvé par les Inventeurs.

- 5 En effet, de manière surprenante, les n-alkanols en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, notamment nébulisées dans les bronches des patients sous forme d'aérosol ou de nébulisat, activent ou potentialisent l'activité de canaux CFTR sauvages ou mutés mais présents à la membrane des cellules notamment chez des patients atteints de mucoviscidose.

- 10 L'activation du canal CFTR par les n-alkanols, pourrait en outre favoriser un effet broncho-dilatateur au niveau des fibres musculaires lisses des bronches et bronchioles, et contribuer à l'amélioration de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose aussi bien que des patients atteints d'insuffisance respiratoire, non liée à une mucoviscidose, telle que l'asthme.

- 15 De manière générale, lesdits n-alkanols peuvent être administrés par voie parentérale : administration intradermique, intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée ; par voie intra nasale et buccale : aspiration ou nébulisation par aérosol ; par voie orale ; par voie sublinguale.

- 20 De manière préférée, lesdits n-alkanols sont administrés sous une forme adaptée à une administration intra nasale ou buccale, de manière à obtenir un contact direct entre lesdits n-alkanols et la surface des muqueuses broncho-pulmonaires. Par exemple, lesdits n-alkanols sont présentés sous une forme liquide, pour une administration sous la forme d'un aérosol ou sous la forme d'un nébulisat, et ce à l'aide d'un dispositif de nébulisation, du type de ceux utilisés aussi bien dans le traitement de l'asthme que dans celui de la mucoviscidose.

- 25 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdits n-alkanols sont associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable adapté à ladite administration intra nasale ou buccale.

- 30 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdits n-alkanols sont de préférence administrés à une concentration comprise entre 0,001 % et 0,1 % (v/v), correspondant à une valeur comprise entre 10 et 1000 ppm (parties par million), soit de 10 mg/kg à 1 g/kg.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'utilisation objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

5 - la figure 1 illustre : (A) Comparaison de l'effet de l'octanol-1 et de la FSK sur l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (% en ordonnée) en fonction du temps (min, en abscisse) dans les cellules CHO-CFTR(+). (B) Effet de l'octanol-1 et de la FSK sur l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (% en ordonnée) en fonction du temps (min en abscisse) dans les cellules contrôles CHO-CFTR(-). (C) Effet de l'octanol-1 (0,25 à 5 mM) et de la FSK (5  $\mu\text{M}$ )  
10 sur l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (vitesse d'efflux en ordonnée) dans les cellules contrôles CHO CFTR(-) (D) Effet de l'inhibition spécifique de CFTR par 100  $\mu\text{M}$  de glibenclamide sur l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (vitesse d'efflux en  $\text{min}^{-1}$  en ordonnée) stimulé par l'octanol-1, la FSK ou l'octanol-1 et la FSK, dans les cellules CHO-CFTR(+).

- la figure 2 illustre l'effet de doses croissantes (en abscisse) de FSK  
15 ou d'octanol-1 sur l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (vitesse d'efflux en  $\text{min}^{-1}$  en ordonnée) dans les cellules CHO-CFTR(+).

- la figure 3 illustre : (A) Effet de la FSK (1  $\mu\text{M}$ ) en présence et en l'absence de glibenclamide (100  $\mu\text{M}$ ) sur le courant enregistré en configuration cellule entière, représentant l'activation du canal CFTR. (B) Effet de l'octanol-1 (1 mM) sur  
20 le courant induit par l'activation de CFTR, en présence et en l'absence de glibenclamide (100  $\mu\text{M}$ ) pour inhiber spécifiquement le canal CFTR. L'enregistrement est effectué dans les cellules CHO-CFTR(+),  $n = 4$ .

- la figure 4 illustre : (A) Effet de la longueur de la chaîne hydrocarbonée des n-alkanols (en abscisse) dans l'activation de l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (vitesse  
25 d'efflux en  $\text{min}^{-1}$  en ordonnée). (B) Effet de l'octanol-2 sur l'activation de l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (vitesse d'efflux en  $\text{min}^{-1}$  en ordonnée).

- la figure 5 illustre l'effet de l'octanol-1 (1 mM) et de l'acide 18-alpha glycerrhetinique ( $\alpha$ -GA 10  $\mu\text{M}$ ) sur la réponse calcique induite par une stimulation d'ATP qui met en jeu la communication intercellulaire.

30 - la figure 6 illustre l'effet du découplage cellulaire dans l'activation de l'efflux de  $^{125}\text{I}$  (% en ordonnée), par une application d'acide 18-alpha glycerrhetinique ( $\alpha$ -GA 10 et 100  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 12$ ), en comparaison à l'effet de l'octanol-1.

- la figure 7 illustre : (A) Effet de l'inhibition de la protéine kinase A par du H-89 (30  $\mu$ M, 30 min) sur l'activation de l'efflux de  $^{125}$ I (taux d'efflux en  $\text{min}^{-1}$  en ordonnée) induite par l'octanol-1 (1 mM), la FSK (1  $\mu$ M) ou une co-stimulation octanol-1 + FSK. (B) Effet de l'inhibition de la protéine kinase C (GF109203X, 100 nM, 30 min) sur l'activation de l'efflux de  $^{125}$ I (taux d'efflux en  $\text{min}^{-1}$  en ordonnée) induite par l'octanol-1 (1 mM).

- la figure 8 illustre l'effet des n-alkanols sur le niveau de l'AMPc intracellulaire total en comparaison au niveau basal et à une stimulation par de la FSK (5  $\mu$ M).

10 - la figure 9 illustre : (A) Effet de l'octanol-1 (1 mM) sur l'efflux d'iodure ( $\text{min}^{-1}$ ) en fonction du temps (min) dans les cellules épithéliales humaines d'origine bronchiques Calu-3, avec (n = 8) ou sans prétraitement par du glibenclamide (100  $\mu$ M, 1 heure) (n = 8), et avec (n = 8) ou sans prétraitement par du DIDS (500  $\mu$ M, 1 heure) (n = 8). La flèche représente le moment où l'octanol-1 (1 mM) est  
15 ajouté, avec ou sans glibenclamide et avec ou sans DIDS. (B) L'effet maximum de l'octanol-1 est normalisé à 100 %. Effet du traitement par du DIDS (500  $\mu$ M, 1 heure) ou du glibenclamide (100  $\mu$ M, 1 heure) sur la réponse maximale de l'octanol-1, le niveau basal est indiqué. (Test t : \*\*\* P < 0.001 ; ns : non significatif). (C) Effet de doses croissantes (en abscisse) d'octanol-1 en présence ou non de FSK (1  $\mu$ M) sur  
20 l'efflux de  $^{125}$ I (vitesse d'efflux en  $\text{min}^{-1}$  en ordonnée) dans les cellules Calu-3. (D) Courbe dose-réponse d'octanol-1 (n = 8 pour chaque concentration testée) en présence ou en absence de FSK (1  $\mu$ M), représentée en % du maximum d'activation obtenue pour 10 mM d'octanol-1. La concentration de demi-effet ( $\text{EC}_{50}$ ) de l'octanol-1 est de 512  $\mu$ M en présence de FSK (1  $\mu$ M) et de 1,14 mM en absence de FSK (1  $\mu$ M).

25 - la figure 10 illustre : (A) Effet de l'octanol-1 (1 mM) (n = 8) ou d'un cocktail de drogues utilisé pour activer de façon maximale le canal muté CFTR- $\Delta$ F508 (FSK 10  $\mu$ M plus génistéine (GST) 30  $\mu$ M) (n = 8) sur l'efflux d'iodure ( $\text{min}^{-1}$ ) en fonction du temps (min) dans les cellules épithéliales bronchiques humaines JME/CF15 extraites à partir de patients atteints de mucoviscidose. La flèche représente le moment où l'octanol-1 (1 mM) ou la FSK 10  $\mu$ M + GST 30  $\mu$ M sont ajoutés.  
30 (B) Représentation du pourcentage d'activation de CFTR- $\Delta$ F508 obtenu avec l'octanol-1 (1 mM) par rapport à l'activité maximale obtenue avec le cocktail FSK

10  $\mu\text{M}$  + GST 30  $\mu\text{M}$ , qui est normalisée à 100 % de la réponse maximale. (C) Effet du prétraitement par du glibenclamide (100  $\mu\text{M}$ , 1 heure) ( $n = 8$ ) ou du prétraitement par du DIDS (500  $\mu\text{M}$ , 1 heure) ( $n = 8$ ) sur la réponse maximale (normalisée à 100 % d'activation) obtenue avec 1 mM d'octanol-1 (Test t : \*\*\*  $P < 0.001$  ; ns : non significatif).

- la figure 11 illustre la réversibilité de l'effet de l'octanol-1 (1 mM) sur l'activation de CFTR étudiée par patch-clamp en configuration cellule entière dans les cellules CHO-BQ1. Famille de courants évoquée dans une cellule CHO-BQ1 par des dépolarisations successives entre -80 et +15 mV à partir d'un potentiel de maintien de -60 mV et par incrémentation de 5 mV, en absence (contrôle), en présence  
10 d'octanol-1 (1 mM) et après 15 min de lavage de l'octanol-1 par un milieu salin physiologique de rinçage.

- la figure 12 illustre la structure des n-alkanols en  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ .

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés  
15 uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**Exemple : Mise en évidence des propriétés des n-alkanols comme ouvreurs ou activateurs de CFTR**

### 1) Méthodes expérimentales.

#### 20 1.1) Cellules en culture.

Les études sur la CFTR sont d'une part réalisées sur des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) qui expriment la protéine CFTR humaine recombinante (CHO-CFTR(+)) (Riordan et al., 1989). Ces cellules sont cultivées à 37°C dans une étuve saturée en eau contenant 5% de  $\text{CO}_2$  dans du milieu  $\alpha\text{MEM}$   
25 additionné de sérum de veau foetal (7,5 %), de 2 mM glutamine, de 50 I.U/ml de pénicilline et de 50  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine. Les cellules qui n'expriment pas la CFTR sont notées CHO-CFTR(-) et sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 dans les mêmes conditions que précédemment.

Les études de CFTR sont aussi réalisées sur les cellules Calu-3  
30 (ATCC n° HTB-55) qui sont des cellules épithéliales pulmonaires humaines exprimant de façon endogène le canal CFTR. Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions de culture que les cellules CHO. L'étude du canal CFTR muté est réalisée



sur les cellules JME/CF15, cellules épithéliales extraites de voies aériennes respiratoires de patients atteints de mucoviscidose (homozygote  $\Delta F508$ ) (Jefferson et al., 1990). Ces cellules expriment donc le canal CFTR muté  $\Delta F508$ . Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que précédemment mais le milieu de culture est  
5 supplémenté avec un mélange hormonal contenant : adénine (180  $\mu M$ ), insuline (5  $\mu g/ml$ ), transférine (5  $\mu g/ml$ ), hydrocortisone (1,1  $\mu M$ ), triiodothyronine (2 nM), épinéphrine (5,5  $\mu M$ ), facteur de croissance épidermique (1,64 nM).

1.2) Technique du patch-clamp, appliquée à l'étude des cellules en culture.

10 La technique du patch-clamp consiste à appliquer une pipette ou une microélectrode de verre à la surface d'une cellule. En aspirant légèrement, il est possible de faire adhérer la membrane au verre. Un petit morceau de membrane (patch) est ainsi isolé au bout de la pipette : c'est le principe du patch-clamp (O.P. Hamill et al. Pflügers Arch., 1981, 391, 85-100 ; R. Penner , A Practical Guide to  
15 Patch Clamping, 1995, In Single Channel Recording, 2<sup>ème</sup> édition (Eds. B. Sakmann et al.) Plenum Press, New York, 3-30). Pour ce faire, la pipette de patch-clamp doit avoir une pointe de l'ordre de 1  $\mu m$  de diamètre et une résistance de l'ordre de 1-5 M $\Omega$ . La résistance d'une pipette ou d'une microélectrode permet d'apprécier la finesse de la pointe : plus la résistance est grande, plus la pointe est fine ou l'électrode est bouchée.  
20 Le diamètre de la pipette de patch-clamp ne permet pas de pénétrer dans la cellule mais par contre, il permet effectivement d'emprisonner un morceau de membrane dans la pointe. Des interactions entre la membrane et le verre vont se former, aidées par une légère succion ou pression négative de la pipette. La qualité de cette interaction (ou scellement) est également appréciée en mesurant la résistance entre le  
25 verre et la membrane. Pour mesurer des courants globaux en configuration cellule entière, une résistance de scellement de 1 G $\Omega$  est suffisante.

De manière générale, on mesure des enregistrements de courant électrique à travers un patch contenant, par exemple, un canal. Le potentiel de membrane imposé ( $E_{clamp}$ ) est généralement en millivolts. Lorsque le canal est fermé  
30 le courant oscille faiblement autour d'un niveau de base (état F). Cet infime courant de base circule dans les « fuites » entre le patch et l'extrémité de la pipette. Lorsque le

canal s'ouvre (état O), le courant saute à un autre niveau, puis revient au niveau de base quand le canal se ferme et ainsi de suite.

Les mesures peuvent être réalisées dans l'une des configurations suivantes : cellule attachée (*cell-attached*), cellule entière (*whole-cell*), patch excisé  
5 intérieur-extérieur (*inside-out*) ou patch excisé extérieur-extérieur (*outside-out*).

Les expériences de patch-clamp sont effectuées sur des cellules confluentes.

De manière plus précise, les boîtes de culture (support des cellules) sont placées dans une cuve d'expérimentation (volume 1 ml) sur la platine d'un  
10 microscope inversé (Nikon) équipé avec un éclairage en contraste de phase. La configuration cellule entière (*whole-cell*) est utilisée pour l'enregistrement des courants cellulaires (Hamill et al., 1981). Les expériences sont réalisées à température ambiante (20-22°C). Les courants sont amplifiés avec un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instrument LTd) possédant un filtre passe-bas de 2-5 kHz (filtre Bessel à 6 pôles) et  
15 enregistrés sur le disque dur d'un ordinateur PC après digitalisation à 10-25 kHz. La fabrication des pipettes s'effectue à partir de tubes de verre de 1 mm de diamètre (Clark Electromedical Instrument) en quatre étapes avec une étireuse horizontale (Bruwn Flaming 97, CA).

Les pipettes, remplies d'une solution intracellulaire contenant en  
20 mM : 60 KCl; 80 NMDG (N-méthyl-G-glucamine); 10 HEPES ; 5 EGTA ; CaCl<sub>2</sub> 1; MgATP 4; Na<sub>3</sub>GTP 0,2; pH 7,4 titré avec KOH), ont une résistance de 5 MΩ. Les potentiels sont exprimés comme la différence entre le potentiel de l'électrode de patch et celui du bain. En configuration cellule entière, ils représentent le potentiel de la membrane de la cellule. Les potentiels de jonction qui se forment entre l'électrode  
25 d'enregistrement et le milieu extracellulaire sont annulés avant le contact de l'électrode avec la cellule. Le potentiel d'inversion du courant chlore est obtenu à partir de l'équation de Nernst ( $E_{rev} = (RT/F) \log ([Cl]_i/[Cl]_e)$ ) ;  $i$  et  $e$  concentration ionique intracellulaire et extracellulaire, R, T et F ont leur signification habituelle. Les relations courant-voltage à l'état stationnaire sont déterminés en utilisant des rampes  
30 lentes (20 mV/.s) de voltage en condition de voltage imposé.

La solution extracellulaire d'enregistrement est constituée (en mM) : 110 NaCl ; 23 NaHCO<sub>3</sub> ; 3 KCl ; 1,2 MgCl<sub>2</sub> ; 2 CaCl<sub>2</sub> ; 5 HEPES ; 11 D-glucose ; gazée avec du CO<sub>2</sub> 5 % - O<sub>2</sub> 95 % ; pH 7,4.

5 1.3) Mesure des flux de traceurs radioactifs appliquée à l'étude des cellules épithéliales en culture.

Le canal CFTR étant perméable aux halogénures (Br > Cl > I > F<sup>-</sup>), la mesure d'efflux d'iodure radioactif <sup>125</sup>I s'est révélé être une technique efficace pour mesurer l'activité du canal CFTR (Chang et al., 1998). Cette technique permet de suivre la cinétique de sortie de l'iodure radioactif <sup>125</sup>I. Les cellules sont cultivées dans  
10 des plaques 24 puits avec une dilution au 1/10 après passage. Le quatrième jour de culture, les drogues à tester sont mises en solution en fonction de la concentration voulue, à 37°C, dans du milieu B à pH 7,4, contenant en mM : 137 NaCl, 5,36 KCl, 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 glucose et 10 HEPES-NaOH. Les puits sont lavés 4 fois avec 500 µl de milieu B. La solution est ensuite remplacée par 500 µl de solu-  
15 tion de charge contenant 1 µM KI et 0.5 µCi de <sup>125</sup>INa/ml pendant 30 min. La cinétique de sortie de <sup>125</sup>i est réalisée après avoir éliminé la solution de charge et lavé 4 fois les puits par 500 µl de milieu B. Pour la cinétique de sortie de <sup>125</sup>I, 500 µl de milieu B contenant ou non les molécules à tester sont incubés 30 sec dans le puits et récupérés dans un tube à hémolyse pour être remplacés par 500 µl de milieu B conte-  
20 nant ou non les molécules à tester. L'opération est répétée toutes les 30 s pendant 2 à 6 min. A la fin de l'efflux, les ions intracellulaires sont extraits en ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique (7,5 %) sur la couche cellulaire. Tous les échantillons sont comptés dans un compteur gamma (Kontron). Les protéines précipitées sont solubilisées dans 0,1 N NaOH et quantifiées en utilisant un test colorimétrique.

25 1.4) Analyse des données

Le traceur contenu dans la couche cellulaire au début de l'efflux est calculé comme la somme des échantillons et des extraits comptés. Les courbes d'efflux sont construites en exprimant le pourcentage du contenu restant dans la couche cellulaire (I%) par rapport au temps. Les constantes de taux d'efflux (k, min<sup>-1</sup>)  
30 stimulé ou non sont déterminés en lissant les courbes d'efflux en une fonction mono-exponentielle  $I\% = 100 \cdot \exp(-kt)$  en utilisant une régression linéaire du logarithme

népérien des données,  $k$  est utilisé pour calculer l'iodure libéré dans le milieu par rapport au temps. L'hypothèse est faite que, en présence d'un stimulateur, l'efflux est la somme de deux efflux d'iodure survenant en parallèle : un efflux basal et un efflux stimulé caractérisé respectivement par les constantes  $k_b$  et  $k_s$ . L'efflux net total est alors décrit par l'équation  $I_t\% = 100 * (1 - \exp(-k_t t))$  où  $k_t$  est la somme de  $k_b$  et  $k_s$ . Finalement,  $k_s$  calculée comme  $k_t - k_b$  est utilisée pour établir une relation dose-réponse pour des antagonistes. Les données sont exprimées comme des moyennes  $\pm$  SD, et le test- $t$  est utilisé pour déterminer les significativités. Les courbes concentration-réponse d'agonistes ou d'antagonistes sont lissées en utilisant l'équation hyperbolique  $Y = Y_{\max} * X / (EC_{50} + X)$ , où  $Y$  est la réponse.  $Y$  commence au basal et va jusqu'au plateau ( $Y_{\max}$ ),  $X$  est la concentration et les valeurs de demi-effet ( $EC$ ) sont calculées en utilisant GraphPad Prism v3.0 (GraphPad Software).

#### 1.5) Dosage de l'AMPc intracellulaire total

Les cellules CHO sont cultivées pendant quatre jours dans une plaque de culture de 24 puits. Au quatrième jour de culture, chaque puits est rincé deux fois avec 500  $\mu$ l de milieu B, et 500  $\mu$ l de ce tampon contenant la molécule à tester sont ajoutés à chaque puits. Après 5 min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée en ajoutant un tampon de lyse cellulaire. La lyse cellulaire est vérifiée au bleu Trypan. La quantité d'AMPc contenue dans les cellules est déterminée en utilisant le kit de dosage *Enzyme Immuno Assay* (Amersham Biotechnology). Le niveau d'AMPc est exprimé en pmoles/puits  $\pm$  SD.

#### 1.6) Imagerie cellulaire et mesure de la concentration intracellulaire de $Ca^{2+}$ ( $[Ca^{2+}]_i$ )

Les mesures de  $Ca^{2+}$  sont réalisées en présence de fura-2 (sonde fluorescente imperméante) qui lie le  $Ca^{2+}$ . Les cellules sont incubées dans du milieu de culture DMEM/F12 sans sérum en présence de la forme perméante du fura-2 (fura-2/AM, 2,5  $\mu$ M) pendant 1h à 37°C. Les cellules placées sur la platine d'un microscope (Olympus) à épifluorescence (objectif 20 X), sont perfusées avec les solutions à tester (e.g ATP, octanol). Elles sont séquentiellement illuminées à 340 nm et 380 nm et la fluorescence émise (F) est mesurée à 510 nm. Elle est détectée via une caméra CCD 12-bits (Sony) connectée à une unité informatique pour le traitement des données (TILL Photonics). La concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire  $[Ca^{2+}]_i$  est calculée en utili-

## 5

Les concentrations des n-alkanols mises en oeuvre vont de 0,1 à 10 mM. Les concentrations représentent des proportions finales (v/v) de 0,001 % (pour 1 mM) à 0,1 % au maximum (pour 10 mM d'alcools).

## 10

Les molécules testées sont les n-alkanols et notamment l'octanol-1, s pour leur capacité à activer le canal CFTR.

Le criblage des molécules en tant qu'ouvreurs du canal CFTR a été évalué en mesurant leur effet sur l'efflux d'iodure radioactif  $^{125}\text{I}$  et sur les courants de membrane. Ces données ont été complétées par la mesure du pH intracellulaire (AMPC) et de ses variations dans diverses situations.

L'évaluation de l'effet d'activation du CFTR par les n-alkanols est réalisée sur la lignée cellulaire CHO-CFTR(+). Les cellules CHO n'exprimant pas la protéine CFTR ont été utilisées comme cellules contrôles. La stimulation par le  $\text{Ca}^{2+}$  (un ionophore de calcium) est sans effet sur l'efflux de  $^{125}\text{I}$  aussi bien dans les cellules CHO-CFTR(+) que CHO-CFTR(-), montrant qu'il n'y a pas de lien direct entre l'augmentation du calcium intracellulaire (Chappe et al., 1998). Le canal CFTR est principalement régulé par des protéines kinases A, les expériences de stimulation par la FSK pour stimuler le taux d'AMPC intracellulaire.

La figure 1A montre une activation de CFTR obtenue par une application de FSK (FSK), d'octanol-1 (1 mM) ou une application combinée de FSK (FSK) et d'octanol-1 (1 mM) dans des cellules CHO-CFTR(+). L'activation est mesurée par l'efflux de  $^{125}\text{I}$  induit une augmentation de l'amplitude de l'efflux (exprimé en % de  $^{125}\text{I}$  libéré dans le milieu) et de la vitesse de sortie

Sur la figure 1B, les expériences contrôles permettant d'évaluer la molécules testées sur l'activité du canal CFTR ont été réalisées sur des

cellules CHO-CFTR(-), en présence ou non d'activateurs (FSK 1  $\mu$ M, octanol-1 1 mM). Dans ces cellules CHO-CFTR(-), l'octanol-1 (0,1 à 5 mM) et la FSK (5  $\mu$ M) ne modifient pas significativement le niveau basal de l'efflux de  $^{125}$ I (figure 1C).

L'effet activateur de l'octanol-1 aussi bien que de la FSK (1  $\mu$ M) ou  
5 d'une application combinée de FSK et octanol-1 sur CFTR est complètement inhibé par l'addition de glibenclamide (100  $\mu$ M) communément utilisé pour inhiber spécifiquement le canal CFTR (Figure 1D). Ces résultats confirment la spécificité de l'octanol-1 sur l'activité de CFTR.

Les cellules CHO-CFTR(+) sont ensuite stimulées avec des concen-  
10 trations croissantes de FSK ou d'octanol-1, et les constantes de vitesses d'efflux de  $^{125}$ I sont mesurées. La figure 2 représente une courbe dose-réponse d'octanol-1 (0,1 à 5 mM) ou de FSK (0,1 à 5  $\mu$ M) sur l'activation de CFTR. On peut voir sur la figure 2 que l'activation de CFTR par la FSK ou par l'octanol-1 est dépendante de la concentration avec une  $EC_{50}$  d'environ 0,5  $\mu$ M pour la FSK et de 0,5 mM pour l'octanol-1.  
15 Les effets de l'octanol-1 sur l'activation du CFTR sont observables pour des concentrations d'octanol-1 de 0,3 mM à 5 mM, avec un plateau atteint à 1 mM et une dose de demi-activation de 0,5 mM.

De même, l'activation de CFTR par la FSK ou l'octanol-1 est obser-  
vée en patch-clamp, en configuration cellule entière. Les figures 3A et 3B montrent  
20 respectivement que la FSK (1  $\mu$ M) et l'octanol-1 (1 mM) produisent une augmentation d'environ 10 fois de la conductance membranaire par rapport au contrôle. Le potentiel de réversion du courant induit par la FSK ou par l'octanol-1 est de  $1 \pm 0,6$  mV, montrant que le  $Cl^-$  est l'ion principal qui contribue à ce courant. Ce courant induit par la FSK ou par l'octanol-1 est complètement inhibé par l'application de glibenclamide  
25 montrant que c'est bien le canal CFTR qui est impliqué dans le courant induit soit par la FSK soit par l'octanol-1. La figure 3B montre qu'une application d'octanol-1 seul (1 mM), c'est-à-dire sans FSK, induit une pleine activation du canal CFTR.

*2.2) L'octanol-1 stimule spécifiquement le canal CFTR dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3).*

30 La capacité de l'octanol-1 à stimuler CFTR dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3) a également été testée. Comme le montre la figure 9A l'octanol-1 active la sortie d'iodure dans les cellules Calu-3. Cet

efflux activé par l'octanol-1 est fortement bloquée par un traitement (1 heure) par le glibenclamide (100  $\mu$ M), un inhibiteur du canal CFTR, alors qu'un traitement (1 heure) par 500  $\mu$ M de DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-acide disulfonique), utilisé pour bloquer les canaux  $\text{Cl}^-$  sauf le canal CFTR qui y est insensible, est sans effet (Figure 9B). L'ensemble de ces résultats montre que l'octanol-1 active spécifiquement le canal CFTR humain endogènement exprimé dans les cellules épithéliales bronchiques humaines Calu-3. De plus, comme observé dans les cellules CHO-CFTR(+) (voir figure 1), l'octanol-1 active le canal CFTR humain d'une manière dose-dépendante (0,1 à 10 mM) dans les cellules Calu-3 (Figures 9C, D). Enfin, une courbe dose-réponse d'octanol-1 réalisée en présence de FSK (1  $\mu$ M) déplace vers la gauche la courbe dose-réponse d'octanol-1, indiquant une potentialisation par la forskoline de l'activation de CFTR par l'octanol-1. En outre, l'activation du canal CFTR par de l'octanol-1 pour des concentrations supérieures à 0,5 mM est supérieure à celle obtenue par la FSK (1  $\mu$ M), puisque l'octanol-1 potentialise l'activité du canal CFTR stimulé par la FSK (1  $\mu$ M) (Figures 9C, D).

*2.3) L'octanol-1 active spécifiquement le canal CFTR muté  $\Delta$ F508 dans des cellules épithéliale d'origine pulmonaire (CF15) de patients atteints de mucoviscidose homozygotes  $\Delta$ F508.*

La capacité de l'octanol-1 à activer le canal CFTR muté  $\Delta$ F508 a été testée. La mutation  $\Delta$ F508 est retrouvée chez plus de 70 % des patients atteints de mucoviscidose. Une grande majorité du canal CFTR muté  $\Delta$ F508 est dégradée par le système ubiquitine-protéasome à l'intérieur de la cellule, et seulement une très faible quantité de canal muté arrive à la surface de la membrane où il peut être activé. Des cellules épithéliales bronchiques humaines JME/CF15 extraites à partir de patients atteints de mucoviscidose et homozygotes pour la mutation  $\Delta$ F508 ont été utilisées. La molécule MPB-91, connue pour adresser un certain nombre de canaux CFTR- $\Delta$ F508 à la membrane plasmique, (Dormer et al., 2001) a également été utilisée. Les canaux CFTR mutés  $\Delta$ F508, présents à la membrane plasmique ont été stimulés, par l'octanol-1 (1 mM). La figure 10A montre que l'octanol-1 active spécifiquement le canal CFTR muté  $\Delta$ F508. Un cocktail de stimulateurs (FSK 10  $\mu$ M + génistéine 30  $\mu$ M) permet d'obtenir l'activité maximale pour le canal muté CFTR- $\Delta$ F508.

L'octanol-1 (1 mM) est capable, à lui seul, d'activer environ 50 % de l'activité maximale du canal CFTR- $\Delta$ F508 muté (Figure 10B). Cette activation de CFTR- $\Delta$ F508 est inhibée par le glibenclamide (100  $\mu$ M) alors qu'elle est insensible au DIDS (500  $\mu$ M) (Figure 10C), démontrant que l'octanol-1 stimule spécifiquement le canal CFTR muté  $\Delta$ F508. De plus, l'octanol-1 n'a aucun effet sur le niveau basal, lorsque le canal muté n'est pas présent à la membrane plasmique, montrant qu'il n'active pas d'autres conductances chlorure et qu'il est bien spécifique du canal CFTR. L'ensemble de ces résultats démontre que l'octanol-1 est capable d'activer le canal CFTR muté  $\Delta$ F508 dans des cellules épithéliales pulmonaires humaines de patients atteints de mucoviscidose. L'octanol-1 est ainsi d'un grand intérêt pour envisager un traitement pharmacothérapeutique de la mucoviscidose.

#### 2.4) L'effet activateur de l'octanol-1 sur CFTR est réversible

Nous avons enfin examiné à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière sur les cellules CHO-BQ1 qui expriment le canal CFTR humain, si l'effet de l'octanol-1 (1 mM) sur les canaux CFTR était réversible. Comme indiqué dans la figure 11, on voit que l'octanol-1 (1 mM) entraîne une augmentation de courant due à l'activation de CFTR. Après 15 min de lavage de octanol-1 (1 mM) par une solution saline physiologique, l'activation des canaux CFTR disparaît, indiquant que l'effet activateur de l'octanol-1 sur CFTR est réversible.

#### 2.5) Les n-alkanols à chaîne hydrocarbonée longue ( $C_6$ à $C_{10}$ ) activent le canal CFTR (voir figure 12 pour la structure des n-alkanols)

L'effet d'autres n-alkanols que l'octanol-1 sur l'activation de CFTR a également été testé. La figure 4A montre que l'utilisation de n-alkanols ayant des longueurs de chaînes hydrocarbonées égales ou supérieures à celles de l'hexanol-1 ( $C_6$ ) jusqu'au décanol-1 ( $C_{10}$ ), active significativement le canal CFTR. L'activation de CFTR augmente en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée (c'est-à-dire en fonction de l'hydrophobicité) de l'alcool. La figure 4 montre une activation croissante de la CFTR suite à l'application d'hexanol-1 ( $C_6$ ), d'heptanol-1 ( $C_7$ ), d'octanol-1 ( $C_8$ ), ou de décanol-1 ( $C_{10}$ ). Pour des n-alkanols ayant des chaînes hydrocarbonées courtes (éthanol, butanol-1), l'efflux de  $^{125}\text{I}$  n'est pas significativement différent de l'efflux non stimulé, indiquant que l'éthanol et le butanol n'activent pas le canal CFTR.



Sur la figure 4B, on peut voir que l'octanol-2 active aussi la protéine CFTR. Ce qui montre que la position du radical OH sur la molécule en position 1 ou en position 2 n'est pas critique pour l'activation du canal CFTR.

2.6) *L'activation de CFTR par les n-alkanols n'est pas due au*  
5 *découplage cellulaire*

L'octanol et les autres n-alkanols peuvent modifier le découplage cellulaire dû aux jonctions communicantes (jonction gap). Un tel découplage est mis en évidence dans des cellules CHO, en mesurant la réponse calcique induite par une application d'ATP. Pour ce faire, une molécule totalement différente des n-alkanols  
10 mais connue pour découpler les cellules, l'acide 18-alpha glycerrhetinique ( $\alpha$ -GA), a été utilisée. Les figures 5A-C montrent que l'application d' $\alpha$ -GA (10 à 100  $\mu$ M) ou d'octanol-1 (1 mM) découple bien les cellules comme le montre la réponse calcique induite par l'ATP. Mais aucun effet de ( $\alpha$ -GA) sur l'activité du canal CFTR n'est observé (Fig. 6). L'activation de CFTR par les n-alkanols n'est donc pas due à leur  
15 propriété de découplage cellulaire.

2.7) *L'activité de la protéine kinase A est nécessaire à l'activation*  
*de CFTR par l'octanol-1*

La phosphorylation du canal CFTR notamment par la protéine kinase A (PKA) a été montrée comme nécessaire pour la fonction et l'activation du  
20 canal. L'activation du canal CFTR par les n-alkanols est inhibée par le traitement avec du H-89 (30  $\mu$ M), utilisé pour inhiber les PKA (Figure 5A), ce qui montre qu'une phosphorylation constitutive du canal CFTR est nécessaire à son activation par l'octanol-1.

De récentes études ont montré qu'une phosphorylation de CFTR par  
25 la protéine kinase C (PKC) pouvait être un pré-requis pour une activation de CFTR. L'octanol a été montré comme pouvant activer certains sous-types de PKC. Un inhibiteur puissant des PKC en présence d'octanol-1 a donc été utilisé. Dans ces conditions, l'activation de CFTR par l'octanol-1 n'est pas inhibée (figure 7). Ces résultats montrent que l'octanol-1 active bien CFTR par un mécanisme indépendant des PKC.

L'octanol et les n-alkanols peuvent interagir directement avec le canal CFTR au niveau des sites hydrophobes de la protéine, afin d'induire une modification de conformation favorable à son activation.

Les n-alkanols n'induisent pas d'augmentation d'AMPc, l'activation  
5 de CFTR par les n-alkanols n'est donc pas due à une élévation du taux d'AMPc induite par les n-alkanols.

La littérature indique que les n-alkanols à chaîne longue ne sont pas des activateurs potentiels de l'adénylate cyclase et donc du niveau d'AMPc intracellulaire mais auraient plutôt un effet inhibiteur. La figure 8 présente les taux  
10 d'AMPc intracellulaire dans la cellule CHO-CFTR(+), mesurés après 5 min en présence de 5  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M de FSK (activateur de l'enzyme de synthèse de l'AMPc ; adénylate cyclase), de 1 mM d'octanol-1, d'hexanol-1 ou d'éthanol. Alors que la FSK 1  $\mu$ M ou 5  $\mu$ M augmente significativement le niveau d'AMPc, ni l'octanol-1, l'hexanol-1 ou l'éthanol ne modifient le niveau basal d'AMPc. Appliqué seul,  
15 l'octanol-1 déclenche l'activation du canal CFTR sans augmenter le niveau d'AMPc. Ces résultats montrent que l'octanol- et les autres n-alkanols à chaîne hydrocarbonée longue en C<sub>6</sub> à C<sub>10</sub> stimulent le canal CFTR par une voie indépendante de la voie de l'AMPc.

#### Références Bibliographiques

- 20 Becq et al., (1994). *PNAS* **91** : 9160-9164  
Becq et al., (1999). *J.Biol.Chem.* **274**: 27415-27425  
Chang et al., (1998). *Methods Enzymol.* **92**: 616-629  
Cutting et al., (1990). *Nature.* **346**: 366-369  
Dalemans et al., (1991). *Nature.* **354**: 526-528  
25 Dormer et al., (2001), *J. Cell Sci.*, **114**: 4073-4081  
Drumm et al., (1991). *Science.* **254**: 1797-1799  
Eidelman et al., (1992). *PNAS* **89**: 5562-5566  
Gregory et al., (1991). *Mol. Cell. Bio* **11** : 3886-3893  
Gribkoff et al., (1994). *J. Biol. Chem.* **269**: 10983-10986

- Griesenbach et al., (1999). *Thorax*. **54** : S19-S23
- Hamill et al., (1981). *Pflugers Arch*. **391** : 85-100
- Marzalec et al., (1994). *J. Pharmacol.Exp. Ther.* **269** : 157-163
- Mascia et al., (2000). *PNAS* **97** : 9305-9310
- 5 Miller & Dallas, (1973). *Arch. Intern. Med.* **131** : 148-155
- Nakahiro et al., (1991). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259** : 235-240
- Narahashi et al., (1998). *Toxicol letter*. **100-101** : 185-191
- Reddy et al, (1999). *Nature*. **402** : 301-304
- Riordan et al., (1989). *Science*. **245** : 1066-1073
- 10 Sakihara et al., (2002). *Anesthesiology*. **96** : 428-437
- Schwiebert et al., (1995). *Cell*. **81** : 1063-1073
- Sheppard et al., (1993). *Nature*. **362** : 160-164
- Tabcharani et al., (1991). *Nature*. **352** : 628-631
- Tsui & Buchwald, (1991). *Advances in human genetic* **20** : 153-266
- 15 Wei et al., (1999) *Pflügers Arch*. **438**: 635-641
- Weingart & Bukauskas, (1998). *Pflügers Arch*. **435** : 310-319

**REVENDEICATIONS**

1°) Utilisation des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, ou cyclique en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies associées à des troubles des canaux chlorure CFTR chez  
5 l'homme ou l'animal.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, dans lesquels le groupe OH est en position 1 (alcool primaire) ou en position 2 (alcool secondaire).

10 3°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées cycliques portant un ou plusieurs groupements alcool.

4°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdites pathologies sont sélectionnées dans le groupe constitué  
15 par la mucoviscidose, les mucoviscidoses atypiques, et les obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives.

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendication s1 à 5, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols se présentent sous une forme adaptée à une administration intra nasale ou buccale.

20 6°) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont présentés sous une forme liquide, pour une administration sous la forme d'un aérosol ou sous la forme d'un nébulisat.

7°) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable  
25 adapté à ladite administration intra nasale ou buccale.

8°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont administrés à une concentration comprise entre 0,001 % et 0,1 % (v/v), correspondant à une valeur comprise entre 10 et 1000 ppm (parties par million), soit de 10 mg/kg à 1 g/kg.

### REVENDEICATIONS

1°) Utilisation des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, ou cyclique en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies associées à des troubles des canaux chlorure CFTR chez  
5 l'homme ou l'animal.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, dans lesquels le groupe OH est en position 1 (alcool primaire) ou en position 2 (alcool secondaire).

10 3°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées cycliques portant un ou plusieurs groupements alcool.

4°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites pathologies sont sélectionnées dans le groupe constitué  
15 par la mucoviscidose, les mucoviscidoses atypiques, et les obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives.

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols se présentent sous une forme adaptée à une administration intra nasale ou buccale.

20 6°) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont présentés sous une forme liquide, pour une administration sous la forme d'un aérosol ou sous la forme d'un nébulisat.

7°) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable  
25 adapté à ladite administration intra nasale ou buccale.

8°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont administrés à une concentration comprise entre 0,001 % et 0,1 % (v/v), correspondant à une valeur comprise entre 10 et 1000 ppm (parties par million), soit de 10 mg/kg à 1 g/kg.

1/11

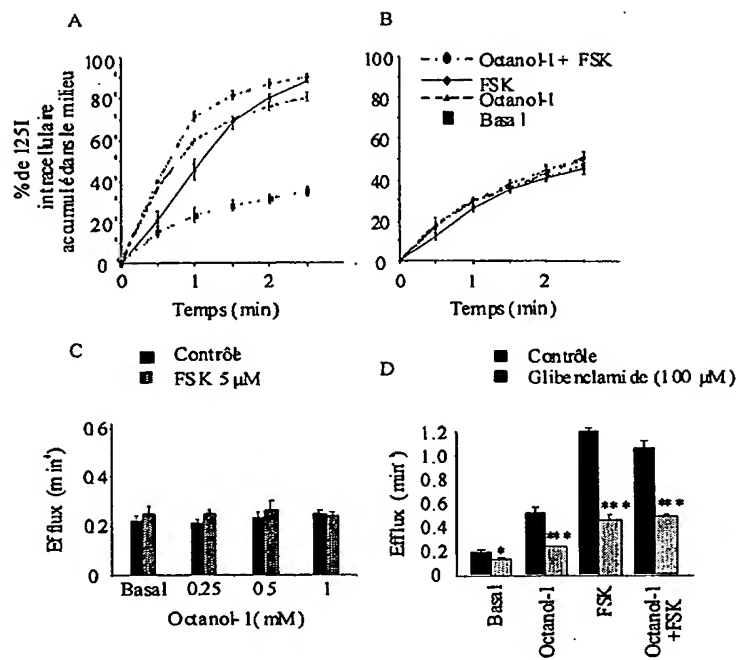


FIGURE 1

2/11

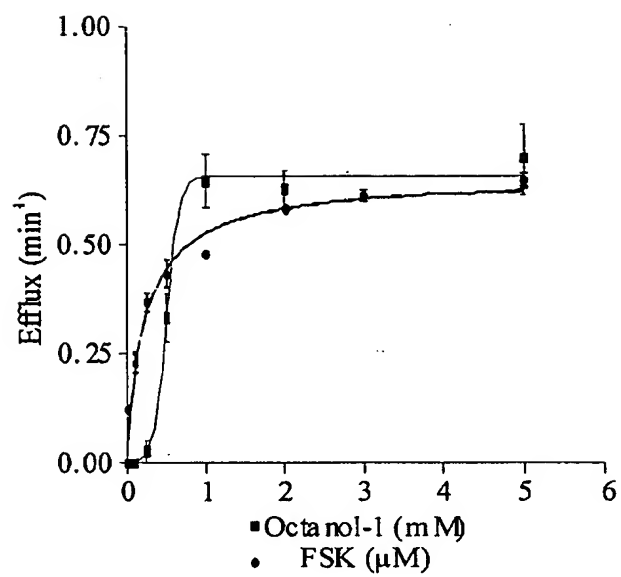


FIGURE 2

3/11

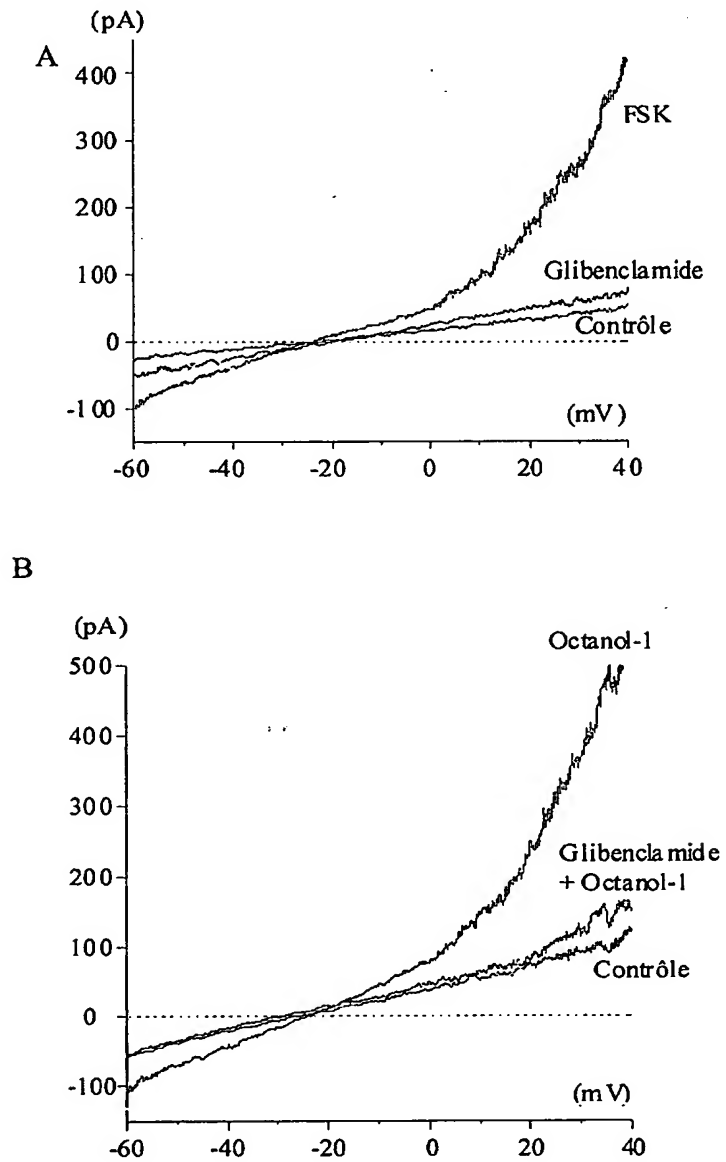
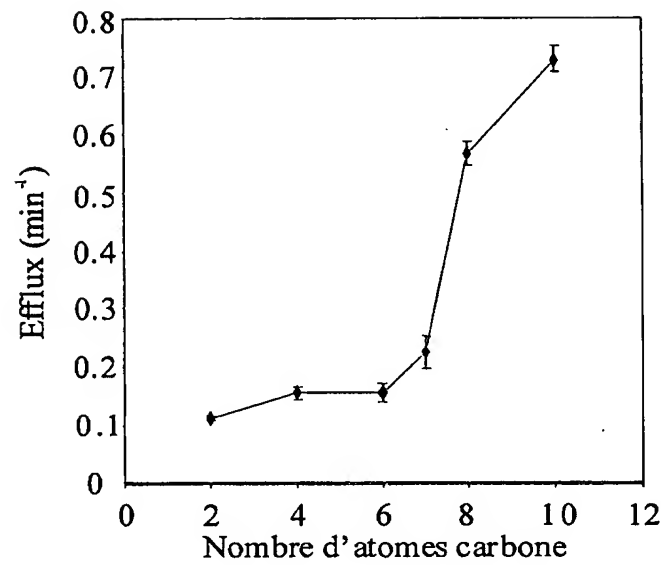


FIGURE 3



4/11

A



B

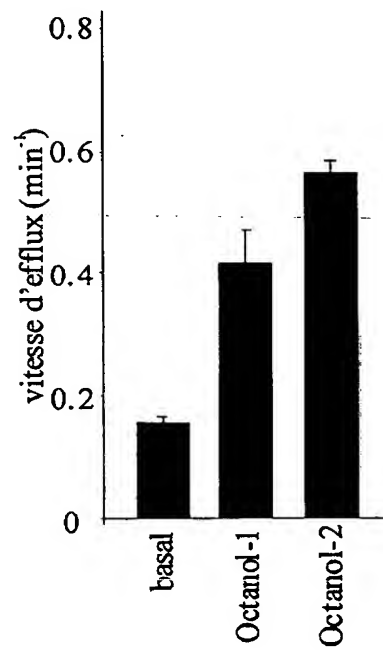


FIGURE 4

5/11

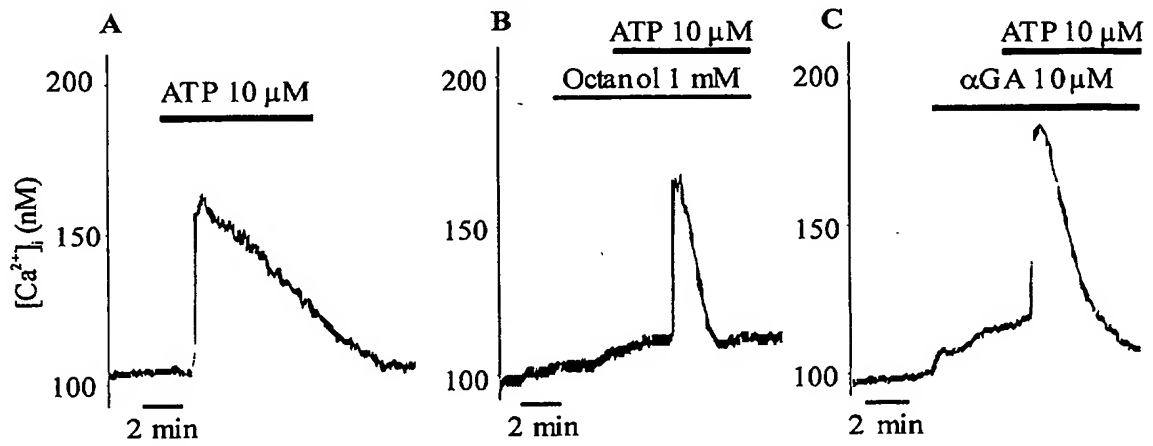


FIGURE 5

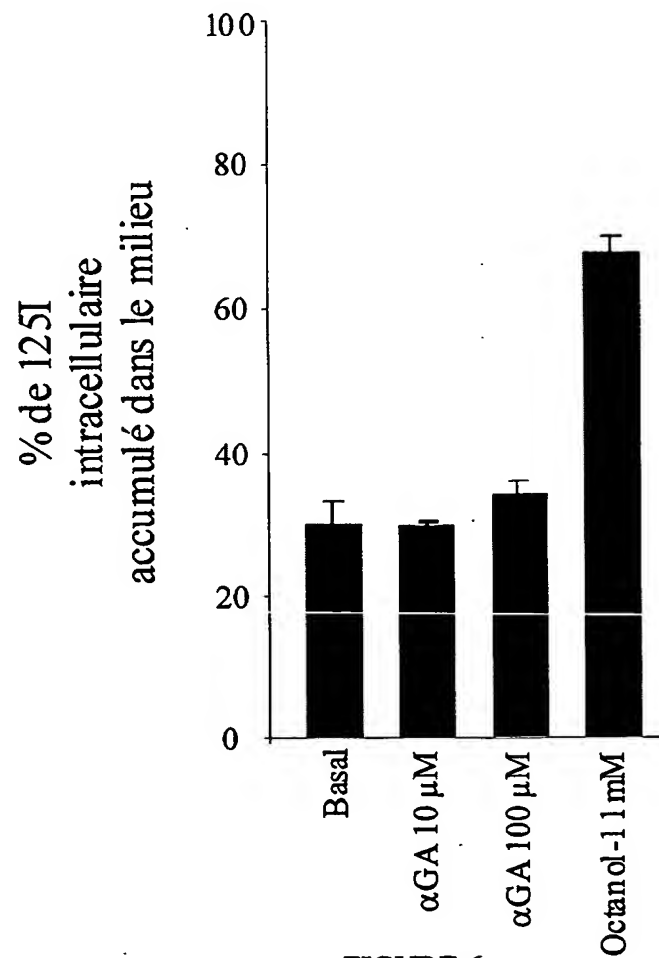


FIGURE 6

6/11

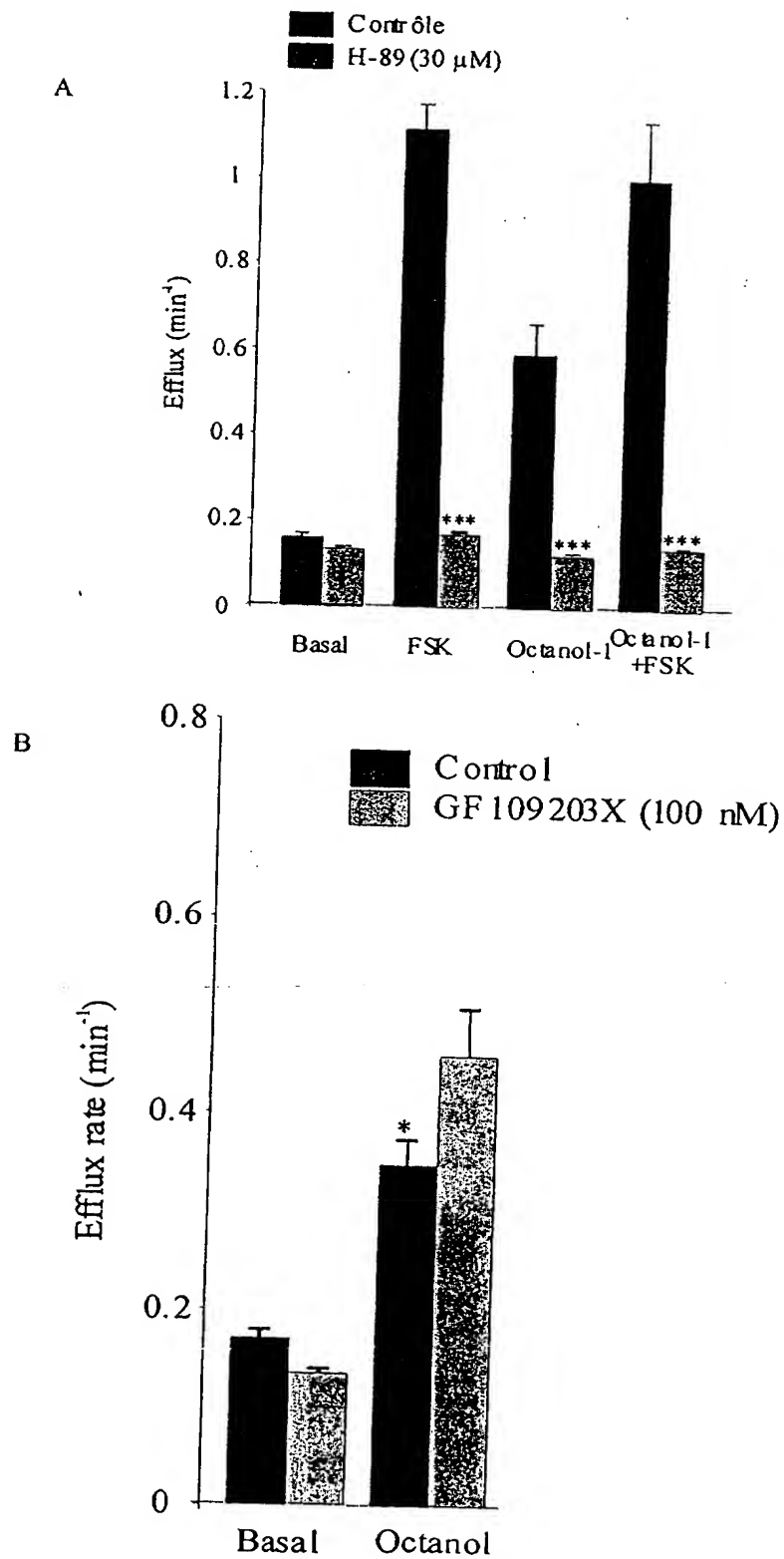


FIGURE 7

7/11

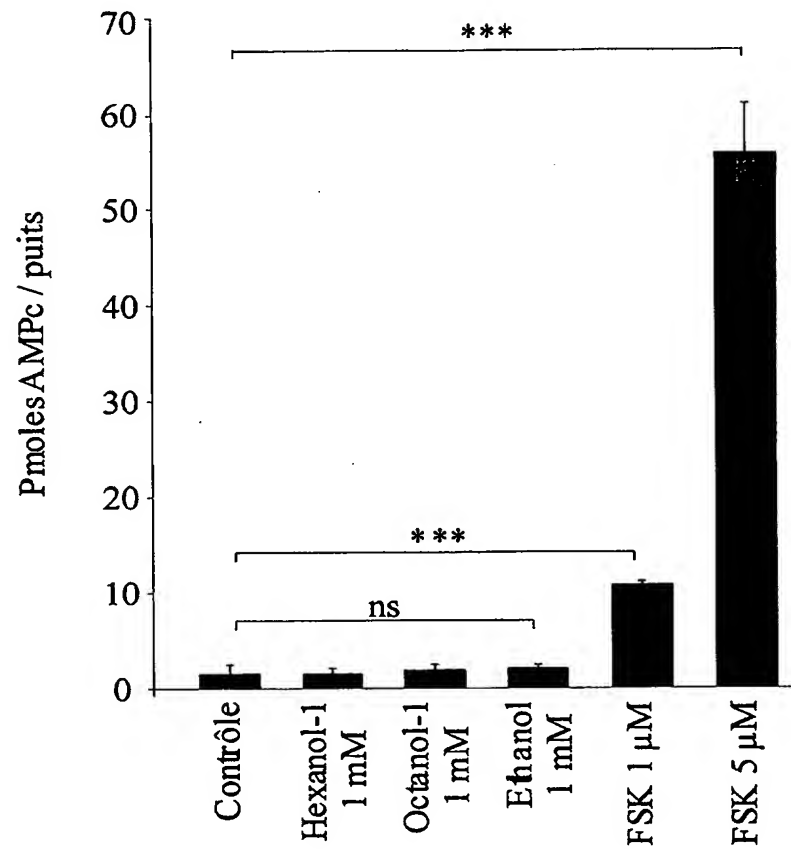


FIGURE 8

8/11

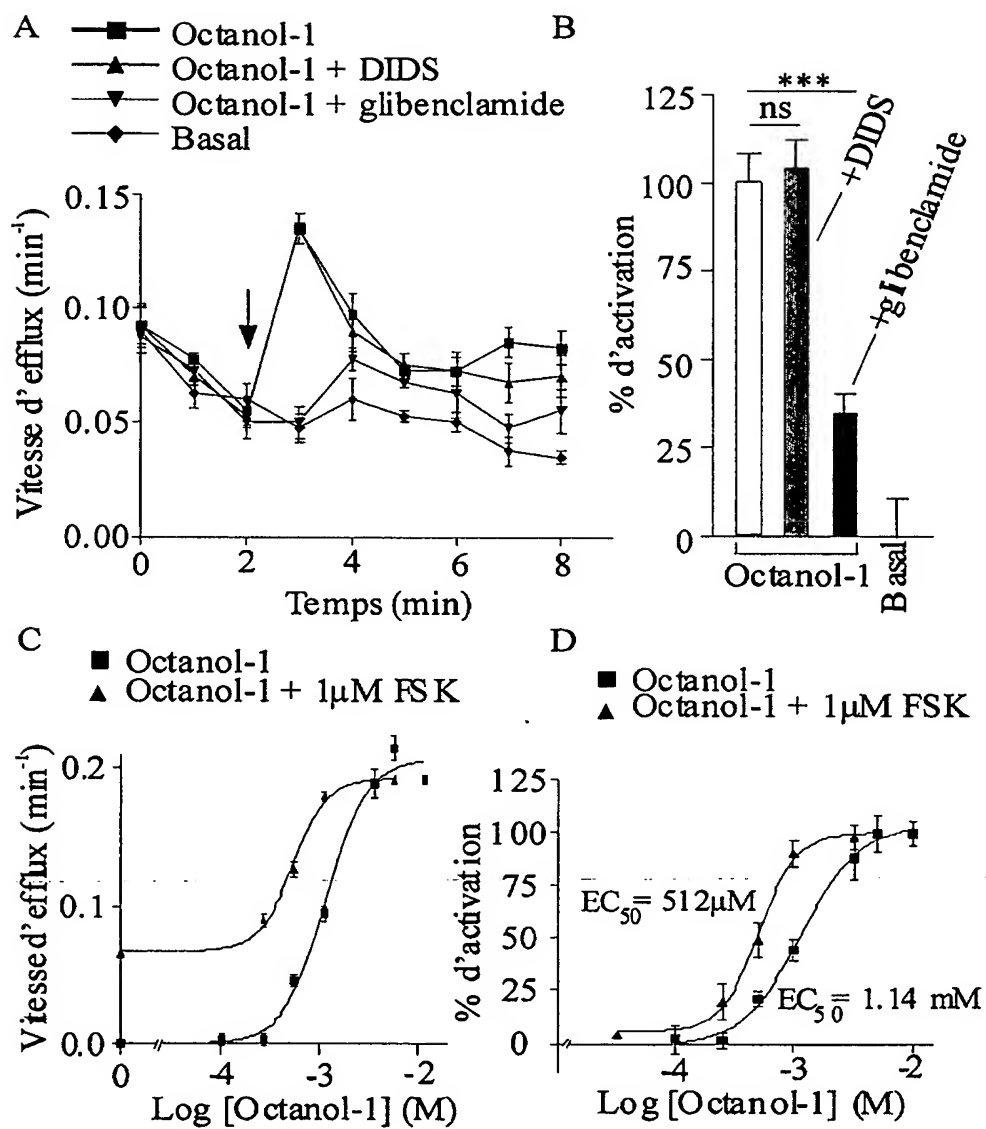


FIGURE 9

9/11

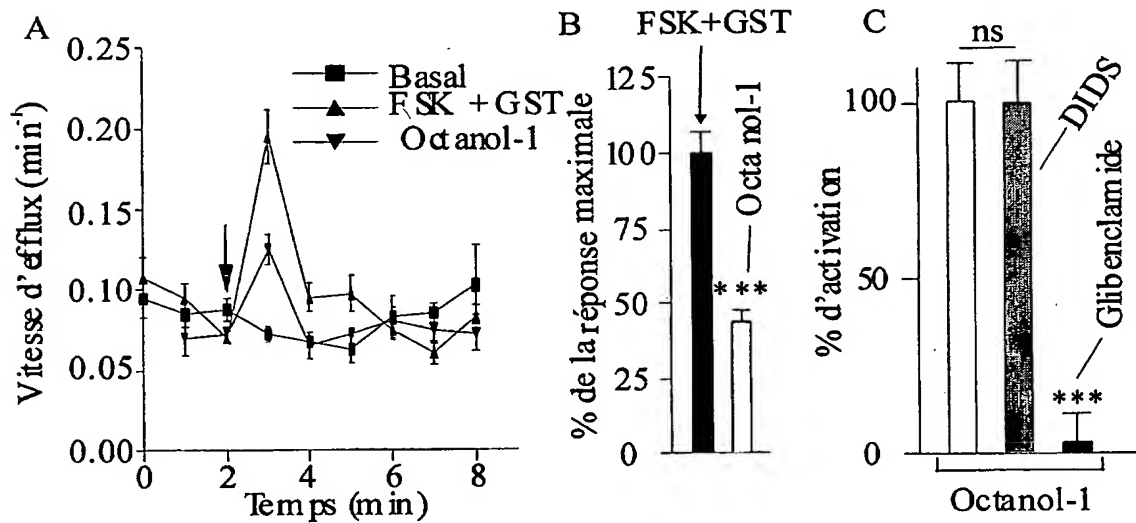


FIGURE 10

10/11

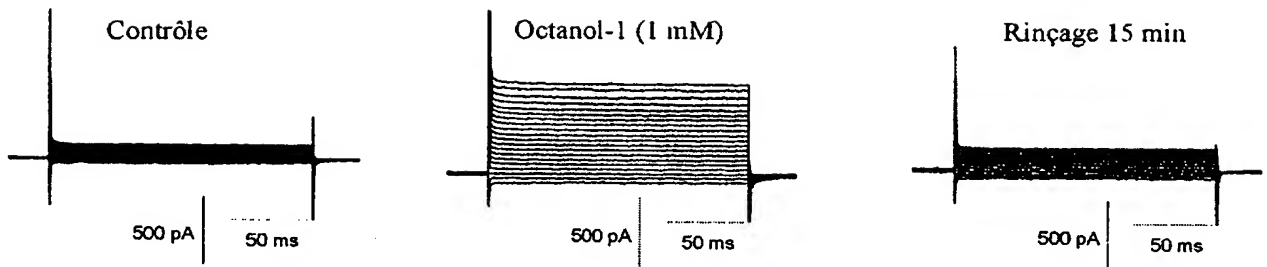


FIGURE 11

11/11

Ethanol :  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Butanol-1 :  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

Hexanol-1 :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{OH}$

Heptanol-1 :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{OH}$

Octanol-1 :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{OH}$

Decanol-1 :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{OH}$

Octanol-2 :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{CH}_3$

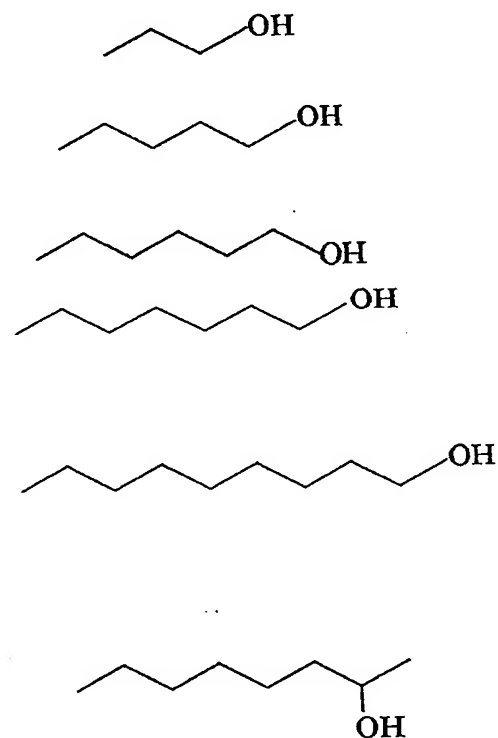


FIGURE 12





# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

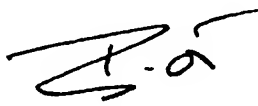
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 ● W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOcp644/107FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0308064
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DES N-ALKANOLS COMME ACTIVATEURS DU CANAL CFTR		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	VERRIER
	Prénoms	Bernard
Adresse	Rue	262 quartier la Roumigière
	Code postal et ville	13360 ROQUEVAIRE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	MARCEY
	Prénoms	Brice
Adresse	Rue	Résidence Les Hauts de Mazargues, Bâtiment B2
	Code postal et ville	13009 MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	DELMAS
	Prénoms	Patrick
Adresse	Rue	IFR Jean Roche
	Code postal et ville	13916 MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Le 2 juillet 2003, 		
Béatrice ORES (n° 92-4046)		

IN THE MATTER OF US PATENT APPLICATION  
Serial number 10/562,085

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Béatrice ORES,  
36 rue de St Pétersbourg  
75008 PARIS (FRANCE)

do solemnly and sincerely declare as follows:

1. that I am a qualified Patent Engineer and am well acquainted with both the French and English languages,
2. that the attached document is a true and correct translation into the English language of the specification n° 0308064  
filed by CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, with their application for a Patent in France on July 2<sup>nd</sup>, 2003

for: "Use of n-alkanols as activators of the CFTR channel".



Declared by the said  
Béatrice ORES

At Paris on January 15th, 2008

FRENCH REPUBLIC



INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

# **PATENT**

**Utility Certificate**

**OFFICIAL COPY**

The Director-General of the Institut National de la Propriété Industrielle certifies that the attached document is a true copy of an application for industrial property titleright filed at the Institute.

Drawn up in Paris, January 4<sup>th</sup>, 2008

On behalf of the Director-General of the Institut National de  
la Propriété Industrielle  
The Patent Department Head

(signature)  
Martine PLANCHE

*Registered Office:* 26 bis, rue de Saint-Pétersbourg – 75800 PARIS Cedex 08 – Telephone : 0 820 213 213 – [www.inpi.fr](http://www.inpi.fr) –  
[contact@inpi.fr](mailto:contact@inpi.fr)

National Public establishment created by Law No. 51-444 of April 19<sup>th</sup>, 1951

1<sup>st</sup> filing**INPI**

**Institut National de  
la Propriété Industrielle**  
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 PARIS Cedex 08

Telephone : 33(1) 53 04 53 04 Telefax : 33(1) 42 94 86 54

## PATENT

# UTILITY CERTIFICATE

## Intellectual Property Code – Book VI

## REQUEST FOR GRANT

page 1/2

## Cerfa

No. 11354\*03

BR1

This form is to be completed in black ink and in block capitals

Reserved for the INPI		1. NAME AND ADDRESS OF THE APPLICANT OR THE REPRESENTATIVE TO WHOM THE CORRESPONDENCE IS TO BE ADDRESSED	
DATE OF SUBMISSIONS OF THE DOCUMENTS : July 2 <sup>nd</sup> , 2003 PLACE : INPI PARIS NATIONAL REGISTRATION 03 08064 DEPARTMENT OF FILING DATE OF FILING : July 2 <sup>nd</sup> , 2003		CABINET ORES 36 rue de St Pétersbourg 75008 PARIS	
Correspondent's references (optional) BLOcp644/107FR			
Confirmation of filing by fax		<input type="checkbox"/>	
2. NATURE OF THE APPLICATION			
Patent		<input checked="" type="checkbox"/>	
Utility certificate			
Divisional application		<input type="checkbox"/>	
Initial application or utility Certificate		N°	Date
Conversion of a European patent application		<input type="checkbox"/>	
Initial application		N°	Date
3. TITLE OF THE INVENTION (maximum 200 characters) USE OF N-ALKANOLS AS ACTIVATORS OF THE CFTR CHANNEL.			
4. PRIORITY DECLARATION OR APPLICATION FOR THE BENEFIT OF THE FILING DATE OF A PRIOR APPLICATION		Country	
		Date	N°
		Country	
		Date	N°
		Country	
		Date	N°
5 - APPLICANT		<input checked="" type="checkbox"/> Legal entity <input type="checkbox"/> Natural person	
Name Or company name		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
First names			
Legal form		Public Establishment	
SIREN N°			
APE-NAF Code			
Address		3 rue Michel-Ange	
Street		75794 PARIS Cedex 16	
Postal code and City		FRANCE	
Country		French	
Nationality		Facsimile number (optional)	
Telephone number (optional)			
E-mail (optional)			

**Fill imperatively the 2<sup>nd</sup> page**

1<sup>st</sup> filing**INPI**Institut National de  
la Propriété Industrielle**PATENT****UTILITY CERTIFICATE****REQUEST FOR GRANT**

page 2/2

**BR2**

Reserved for the INPI		
DATE OF SUBMISSIONS OF THE DOCUMENTS : July 2 <sup>nd</sup> , 2003 PLACE : INPI PARIS NATIONAL REGISTRATION 03 08064 DEPARTMENT OF FILING		
<b>6. REPRESENTATIVE</b>		
Name		ORES
First name		Béatrice
Company		CABINET ORES
No. of permanent Power of attorney		
Address		Street
		36 rue de St Pétersbourg
		Postal code and city
		75008 PARIS
		Country
		FRANCE
Telephone number (optional)		01. 53. 21. 11. 00
Facsimile number (optional)		01. 53. 21. 08. 88
E-mail (optional)		ores@cabinet-ores.com
<b>7. INVENTOR(S)</b>		Inventors are Natural persons
The inventors are the applicants		<input type="checkbox"/> yes <input checked="" type="checkbox"/> no : If the answer is no, provide a separate designation
<b>8. SEARCH REPORT</b>		
		immediate or deferred
		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Spread out payment of the fee (in two payments)		Only for Natural persons filing <input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
<b>9. REDUCTION OF THE RATE OF FEES</b>		Only for Natural persons <input type="checkbox"/> requested for the first time for this invention <input type="checkbox"/> requested prior to filing (attach copy of the favourable decision)
<b>10. SEQUENCE LISTING AND/OR AMINO ACID</b>		<input type="checkbox"/> The description contains a sequence listing
Electronic file is enclosed		<input type="checkbox"/>
Declaration that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing is enclosed		<input type="checkbox"/>
<b>SIGNATURE OF THE APPLICANT OR REPRESENTATIVE</b> (name and capacity of the signatory)  (signature)  Representative,  Béatrice ORES (N°92-4046)		<b>SIGNATURE AFTER REGISTRATION OF THE APPLICATION AT THE INPI</b>    (illegible signature)

**USE OF N-ALKANOLS AS ACTIVATORS OF THE CFTR CHANNEL**

The present invention relates to a novel use of n-alkanols as CFTR (cystic fibrosis transmembrane  
5 conductance regulator) channel activators and to the application of said use to treatments for pathologies in which a dysfunction of said channel is observed, such as cystic fibrosis.

The CFTR protein, located in the apical region  
10 of epithelial cells, is a chloride channel controlled by the cAMP and involved in the hydration of fluids secreted by the submucosal glands. A dysfunction of this CFTR channel is responsible for cystic fibrosis, an autosomal recessive genetic disease.

15 In epithelial cells, water transport and electrolyte transport are associated with an increase in membrane permeabilities for  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  ions. These water and electrolyte movements are related to the activity of specialized membrane proteins (ion  
20 channels, transporters) that have a precise location in the plasma membrane of the cell (apical or mucosal pole; basolateral or serosal pole). The techniques of molecular electrophysiology (patch-clamp) and of ion flux measurement make it possible to study  
25 transepithelial ion transport, regulation thereof and pathological deregulation thereof.

A dysfunction of epithelial cells, and in particular that of electrolyte transport, is the cause of many physiopathologies, such as cystic fibrosis  
30 (CF) (or mucoviscidosis), which is considered to be an exocrine gland genopathy.

The gene called CF involved in cystic fibrosis has been identified, cloned and located on the long arm of chromosome 7 (Riordan et al., 1989). Cystic fibrosis  
35 is the most common autosomal recessive genetic disease in Caucasian populations. In the United States and in most European countries, the frequency of heterozygous carriers of the mutated CF gene is 1 in 20 to 1 in 30, which represents one birth of an affected child in

approximately 2500 to 3000. Progress made in the field of medical and biological research has, since the 1960s, brought about considerable progress in the life expectancy of patients suffering from cystic fibrosis, who today live to approximately 30 years old. The CF gene consists of 250 000 base pairs defining 27 exons and encodes the CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) protein, which comprises 1480 amino acids (Riordan et al., 1989). Cystic fibrosis is a canalopathy, i.e. a pathology related to an ion channel dysfunction, insofar as the CFTR protein has been characterized as a chloride channel. At the current time, more than 1300 mutations in the CF gene, which impair the properties and the function of the CFTR channel, have already been reported.

The CFTR protein is expressed in many organs, including the exocrine pancreas, the lungs, the sweat glands, the intestine, the hepatic tissue, the reproductive system, the kidneys and the heart tissue.

The interest given to cystic fibrosis has had considerable consequences in terms of the understanding of the secretory mechanisms of normal epithelial cells. The epithelial cells of the exocrine glands of various organs, such as the intestine, the pancreas or the lungs, control water and salt transport in the tissues. The CFTR protein, which is especially located at the apical pole of epithelial cells, is a low-conductance chloride channel activated by the cAMP pathway.

CFTR is involved in the hydration of fluids secreted by the submucosal glands and is thought to influence the secretion of mucins, which are glycoproteins that contribute in particular to the formation of the bronchial mucus.

In cystic fibrosis, the dysfunction of the CFTR channel affects the cAMP-activated apical secretion of Cl ions. The electrolyte transport, which has become abnormal, causes thickening of the extracellular mucus and thus leads to obstructions in the lumens of the various tissues. These obstructions cause chronic

bronchitis due to opportunistic pulmonary bacterial infections, pancreatic and hepatic insufficiencies, abnormally concentrated sudoriparous secretion, and male infertility.

5           The CFTR protein is a glycoprotein with a molecular weight of 170 kD comprising five domains (Riordan et al., 1989); two transmembrane domains each with 6 transmembrane segments or  $\alpha$ -helices (numbered from 1 to 12, each comprising 21 to 22 amino acids),  
10 two nucleotide-binding intracellular domains (NBD1 and 2 for nucleotide binding domain) and a large intracellular regulatory domain (R domain).

          The regulation of CFTR has been particularly studied. Two complex processes control the activity of  
15 the CFTR channel; phosphorylation of the R domain by protein kinases and binding and hydrolysis of ATP to and on the two NBD domains. Dephosphorylation of the CFTR channel results in a loss of activity of the channel until it closes (Tabcharani et al., 1991; Becq  
20 et al., 1994).

          Several studies have shown that the CFTR protein has, in addition to its chloride channel activity, many other cellular functions that have not yet been elucidated. It is thought to regulate other  
25 ion channels, such as the outwardly rectifying chloride channel ORCC (Schwiebert et al., 1995), the epithelial sodium channel ENaC (Quinton et al., 1999) or the calcium-dependent chloride channel CaCC (Wei et al., 1999). It is also thought to have a regulatory activity  
30 on ATP release from the inside to the outside of the cell (Schwiebert et al., 1995).

          CFTR shares sequence and structural homology with ABC (for "ATP-binding cassette") transporters which constitute a large family of membrane proteins  
35 that are very conserved in evolution. These transporters are involved in the translocation of varied substrates through cell membranes. However, while, in prokaryotes, many transporter/substrate couples have been defined, this information is more



rare among eukaryotes. In mammals, there are currently 48 ABC transporters, the dysfunctions of which could be related to a pathology. The P-glycoprotein (or MDR for multidrug resistance) is involved in cytotoxic drug rejection. CFTR controls transepithelial chloride transport and the hydration of mucosal compartments, whereas one of the isoforms of MDR is thought to be more involved in phosphatidylcholine translocation.

Among the around 1300 mutations of the CF gene recorded to date and which cause cystic fibrosis, the one most commonly found is a deletion of three base pairs in a coding region (exon 10) of the CF gene. This mutation corresponds to the deletion, in the protein, of a phenylalanine at position 508 ( $\Delta F508$ ) in the NBD1 domain. The frequency of appearance of this mutation is 70% of the mutated alleles on average in genetic analyses (Tsui et al., 1991), and 50% of patients are homozygous for this mutation. The consequences of this mutation are dramatic because the abnormal protein derived from the transcription of the mutated gene ( $\Delta F508$ ) is no longer capable of performing its functions in chloride transport in the affected epithelial cells. The absence of a chloride current after stimulation of the exocrine gland epithelial cells by cAMP is the main characteristic that shows the presence of an abnormality in the CF gene and in particular of the mutation ( $\Delta F508$ ). The highest density of mutations is found in the two nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2). Seven other important mutations are present with frequencies of greater than 1%. The G551D mutation corresponds to the substitution of a glycine residue (G) at position 551 of the protein with an aspartic acid (D). CF patients carrying this mutant have a severe pathology with pancreatic insufficiency and serious pulmonary disorders (Cutting et al., 1990). The frequency of observation of this mutation reaches 3 to 5% in certain populations of patients suffering from cystic fibrosis. Unlike the  $\Delta F508$  deletion, the CFTR protein carrying the G551D

mutation is mature and is incorporated into the membrane (Gregory et al., 1991). However, the mutation results in membrane impermeability and stimulation of the cAMP pathway does not open the channel associated with the expression of this mutant (Gregory et al., 1991; Becq et al., 1994). Other mutations, such as R117H, R334W and R347P, appear with low frequencies of 0.8, 0.4 and 0.5%, respectively, and are associated with less severe pathologies (Sheppard et al., 1993). These three mutants express a mature CFTR protein that is glycosylated, allowing its insertion into the membrane. However, the current amplitude, the unit conductance and the probability of opening the channel, which are associated with each of the three mutations, are modified (Sheppard et al., 1993; Becq et al. 1994). The regulation via the cAMP pathway appears, however, to be normal for these three various mutants, including for  $\Delta F508$  (Becq. et al., 1994).

Heterozygous carriers of the CF gene, i.e. having one copy of the normal gene and one of the mutated gene, are generally healthy and represent approximately 5% of the Caucasian population. A selective advantage is suggested to explain the relatively high percentage of this mutation in the heterozygous state in the course of evolution. Heterozygous individuals are thought to have been more resistant to epidemics of typhoid fever, of cholera, of tuberculosis or of secretory diarrhea.

However, a correlation between carriers heterozygous for the CF gene and susceptibility to developing various pathologies, such as asthma, nasal polyposis, chronic sinusitis and bronchitis, bronchiectasis, allergic bronchopulmonary aspergillosis or pancreatitis, has been established by certain studies (Griesenbach et al., 1999). Mutations occurring in flanking regions between exon-introns of the CF gene have also been described. For example, 9-, 7- or 5-thymidine polymorphic variants exist between the intron 8 and the exon 9. The 5T polymorphic variant

decreases synthesis of the CFTR protein, which incidentally is normal. The combination of the 5T variant on one allele with a mutation of CFTR on the other allele results in congenital agenesis of vas deferens (CAVD), characterized in male patients by secretory infertility with no other conventional cystic fibrosis condition. A certain proportion of sterile men could in fact be carriers of these mutations in the CF gene, without developing cystic fibrosis per se.

10 This discovery opens up a discussion on the diagnosis and classification of cystic fibrosis, related to the physiological disorders listed in heterozygous individuals. Alongside the cases of conventional cystic fibrosis, the following atypical cases could thus be defined:

- 15 - in the conventional case, sick homozygous patients (e.g.  $\Delta F508/\Delta F508$ ) or composite heterozygous patients (e.g.  $\Delta F508/G551D$ ) exhibit most of the conditions characterized by this disease;
- 20 - in atypical cases, the patients, composite heterozygotes ( $\Delta F508/5T \dots$ ) or true heterozygotes, show various conditions: CAVD, asthma, chronic sinusitis, etc., as specified above.

In order to overcome the functional CFTR protein deficiency, both in conventional cases of cystic fibrosis and in atypical cases marked by various conditions (asthma, bronchiectasis, sinusitis, etc.), it is possible to envision pharmacologically activating the wild-type CFTR protein that is still present (heterozygotes), and the mutants, such as  $\Delta F508$  or  $G551D$ , that are inserted into the membrane but inactive. Despite deficient targeting of the  $\Delta F508$  protein into the membranes of epithelial cells affected by cystic fibrosis, several groups have shown that this protein could be functionally present, in small numbers, in the membranes (Dalemans et al., 1991; Drumm et al., 1991; Becq et al., 1994).

Thus, the use of CFTR channel activators, and in particular of CFTR channel openers, can optimize the

chances of success of a pharmacotherapy of diseases related to a dysfunction of the CFTR channel.

Despite the progress made in the genetics of cystic fibrosis and in the biology and biochemistry of the CFTR protein, the pharmacology of CFTR channel  
5 openers is relatively undeveloped.

Several studies have shown that, in addition to the general agents which are known to activate the CFTR protein via the cAMP pathway, such as forskolin (FSK),  
10 it is possible to use other molecules for activating CFTR channels. The mode of action of these activators is still relatively unknown and their effects limited.

Mention may be made of the few families of molecules known today for their CFTR channel activating  
15 or opening properties:

- Phenylimidazothiazoles (levamisole and bromotetramisole) (Becq et al., 1994). It has been shown that levamisole and bromotetramisole make it possible to control the activity and level of  
20 phosphorylation of the CFTR channel. However, these molecules do not appear to be able to act in all cells. In addition, in a transgenic mouse model exhibiting the G551D/G551D mutation, bromotetramisole did not have the expected activating effect.

25 - Benzimidazolones (NS004) (Gribkoff et al., 1994). These compounds, derived from the imidazole ring, such as levamisole, can, under certain conditions, and in particular when the CFTR channel has been phosphorylated, open the channel. Benzimidazolones  
30 are also, however, activators of many potassium channels (Olesen et al., 1994) and are, consequently, not very specific for the CFTR channel.

- Substituted xanthines such as IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) or theophylline are first  
35 known as inhibitors of intracellular phosphodiesterases (cAMP-degrading enzymes), phosphatases and adenosine-binding membrane-receptor antagonists; they also act on intracellular calcium mobilization. Independently of these properties, they are CFTR channel activators

(Chappe et al., 1998). The mechanism of action of xanthines on CFTR is still poorly understood, but could involve their binding to the nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2).

5                   - Benzo(c)quinolizinium (PCT international application WO 98/05642; Becq et al., 1999) which are more specific for CFTR but can induce adverse effects; specifically, these molecules activate the CFTR channel via a cAMP-independent pathway. However, at the current  
10 time, toxicity tests relating to this family of molecules have not yet been carried out and it is not improbable that these molecules may prove to have toxic effects on animals.

                  Thus, all the treatments currently recommended  
15 either lack specificity or cause too many adverse effects.

                  For this reason, the applicant has given itself the aim of providing medicinal products that specifically activate the CFTR chloride channel, while  
20 at the same time not modifying the baseline cAMP level, and that are for use in the treatment of pathologies related to transmembrane ion flux, especially chloride flux conditions, and especially in epithelial cells in humans or animals.

25                   The aim of the present invention is more particularly to provide novel medicinal products that can be used in the context of the treatment of cystic fibrosis, or of cases of "atypical cystic fibrosis" (asthma, chronic sinusitis, bronchiectasis, etc.), or  
30 of the prevention or treatment of obstructions of the bronchial tracts or of the digestive (especially pancreatic or intestinal) tracts, or of cardiovascular diseases or else kidney diseases.

                  Inventors have in fact found, surprisingly,  
35 that certain n-alkanols specifically activate the CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) chloride channel. The activity of the CFTR channel is measured by means of the radioactive iodide (<sup>125</sup>I) efflux technique or of the patch-clamp technique. The

order of activation of CFTR by n-alkanols is hexan-1-ol<heptan-1-ol<octan-1-ol<octan-2-ol<decan-1-ol (1 mM).

A subject of the present invention is, consequently, the use of C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> linear, possibly  
5 branched, or cyclic hydrocarbon-chain n-alkanols, for preparing a medicinal product for use in the treatment of pathologies related to CFTR chloride channel (transmembrane chloride flux) disorders, in particular in epithelial cells, in humans or animals.

10 The fact that the C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> n-alkanols do not modify the cAMP level in the cells is an advantage for at least two reasons:

- this favors a specificity of interaction between the n-alkanols and the CFTR channel;
- 15 - this makes it possible to prevent nonspecific side effects which can be induced by an increase in cAMP in the cells.

According to an advantageous embodiment of said use, said n-alkanols are linear, possibly branched,  
20 hydrocarbon-chain n-alkanols in which the OH group is in the 1-position (primary alcohol) or in the 2-position (secondary alcohol).

According to another advantageous embodiment of said use, said n-alkanols are cyclic hydrocarbon-chain  
25 n-alkanols carrying one or more alcohol groups (cyclohexane, for example).

The n-alkanols have, in this application, a certain number of advantages:

- no activation by the n-alkanols is detected  
30 in control CHO cells that do not express CFTR, whereas the activation of CFTR by the n-alkanols in CHO (Chinese hamster ovary) cells expressing the CFTR channel is blocked by the addition of glibenclamide (100 µM), used to specifically block the CFTR channel;
- 35 - the n-alkanols do not modify the baseline cAMP level; the n-alkanols thus specifically activate the CFTR channel via a cAMP-independent pathway. The activation of CFTR by the n-alkanols is independent of

the potential effect of these molecules on cellular uncoupling;

- the n-alkanols act via a protein kinase C-independent mechanism.

5        Among the n-alkanols, it is especially octanol that has already been proposed in many applications:

1. as anesthetic molecules; it exerts complex effects on biological membranes. A physicochemical theory had been put forward to explain the effector  
10        potency of anesthetics. The effectiveness of anesthetics is thought to increase as a function of their solubility in fats and is thought to be a linear function of the octanol-water partition coefficient (Meyer-Overton rule on anesthesia). In fact, the  
15        mechanisms involved in the effects of n-alkanols have not been elucidated. However, two general hypotheses have been proposed to explain the effects of n-alkanols on proteins associated with biological membranes:

- The first suggests that n-alkanols impair the  
20        physical properties of the membrane, which properties are required for the normal functioning of membrane proteins.

- The second suggests that n-alkanols bind directly in hydrophobic regions specific for proteins  
25        (Mascia et al., 2000).

It is probable that the two mechanisms are involved. However, it is currently the second hypothesis that holds the interest, the first having been contradicted by experiments which show that  
30        disturbances in membrane fluidity, engendered by n-alkanols, were mimicked by an increase in body temperature (fever), without the same effects being observed, however, on the electrical activity.

A common characteristic of the action of these  
35        molecules is the modulation of the electrical signal that is due to the impairment of the membrane conductance by the ion channels.

2. In the regulation of the Cl<sup>-</sup> channel receptor for GABA (gamma-aminobutyric acid) (Narahashi et al.,

1998; Marszalec et al., 1994; Nakahiro et al., 1991). These receptors are expressed in the central nervous system.

3. As bronchodilators: n-alkanols are involved  
5 in relaxation of the smooth muscles of the airways by decreasing in particular the intracellular concentration of calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Sakihara et al., 2002).

4. Action at cell junctions by impairing the  
10 conductance of the gap junctions in many tissues, including the epithelial tissue (Weingart et al., 1998); this effect concerns more specifically lipophilic agents, such as long-chain n-alkanols. The molecular mechanism resulting from the cellular  
15 uncoupling remains obscure.

5. Alcohols such as octanol, as anti-emulsifying agents, have already been used, in an aerosol, in patients suffering from pulmonary edema (Miller et al., 1973), but their mechanisms of action  
20 remain unknown.

The use of certain n-alkanols in the treatment of pathologies related to transmembrane chloride ion flux disorders in epithelial cells, and in particular of cystic fibrosis and of atypical cystic fibroses,  
25 have just been found by the inventors.

Specifically, surprisingly,  $C_6$ - $C_{10}$  n-alkanols, in particular nebulized in the bronchi of patients in the form of an aerosol or of nebulized material, activate or potentiate the activity of wild-type CFTR  
30 channels or CFTR channels that have mutated but present at the cell membrane, in particular in patients suffering from cystic fibrosis.

The activation of the CFTR channel by n-alkanols could also promote a bronchodilator effect  
35 in the smooth muscle fibers of the bronchi and bronchioles, and contribute to improving the respiratory function of patients suffering from cystic fibrosis, along with patients suffering from



respiratory insufficiency not related to a cystic fibrosis, such as asthma.

In general, said n-alkanols can be administered parenterally: intradermal, intravenous, intramuscular  
5 or subcutaneous administration; intranasally or buccally: aspiration or nebulization by aerosol; orally; sublingually.

Preferably, said n-alkanols are administered in a form suitable for intranasal or buccal  
10 administration, so as to obtain direct contact between said n-alkanols and the surface of the bronchopulmonary mucosae. For example, said n-alkanols are provided in a liquid form, for administration in the form of an aerosol or in the form of nebulized material, by means  
15 of a nebulization device, of the type such as those used both in the treatment of asthma and in that of cystic fibrosis.

According to another advantageous embodiment of the invention, said n-alkanols are combined with at  
20 least one pharmaceutically acceptable carrier appropriate for said intranasal or buccal administration.

According to another advantageous embodiment of the invention, said n-alkanols are preferably  
25 administered at a concentration of between 0.001% and 0.1% (v/v), corresponding to a value of between 10 and 1000 ppm (parts per million), i.e. from 10 mg/kg to 1 g/kg.

Besides the arrangements above, the invention  
30 also comprises other arrangements which will emerge from the description which follows, which refers to examples of implementation of the use which is the subject of the present invention, and also to the attached drawings in which:

35 - figure 1 illustrates: (A) Comparison of the effect of octan-1-ol and of FSK on  $^{125}\text{I}$  efflux (% along the y-axis) as a function of time (min, along the x-axis) in CHO-CFTR(+) cells. (B) Effect of octan-1-ol and of FSK on  $^{125}\text{I}$  efflux (% along the y-axis) as a

function of time (min, along the x-axis) in CHO-CFTR(-) control cells. (C) Effect of octan-1-ol (0.25 to 5 mM) and of FSK (5  $\mu$ M) on  $^{125}$ I efflux (rate of efflux, along the y-axis) in CHO-CFTR(-) control cells. (D) Effect of the specific inhibition of CFTR with 100  $\mu$ M of glibenclamide on  $^{125}$ I efflux (rate of efflux in  $\text{min}^{-1}$ , along the y-axis) stimulated by octan-1-ol, FSK or octan-1-ol and FSK, in CHO-CFTR(+) cells;

10 - figure 2 illustrates the effect of increasing doses (along the x-axis) of FSK or of octan-1-ol on  $^{125}$ I efflux (rate of efflux in  $\text{min}^{-1}$ , along the y-axis) in CHO-CFTR(+) cells;

15 - figure 3 illustrates: (A) Effect of FSK (1  $\mu$ M) in the presence or absence of glibenclamide (100  $\mu$ M) on the current recorded in the whole cell configuration, representing the activation of the CFTR channel. (B) Effect of octan-1-ol (1 mM) on the current induced by the activation of CFTR, in the presence or absence of glibenclamide (100  $\mu$ M) for specifically inhibiting the CFTR channel. The recording is carried out in CHO-CFTR(+) cells,  $n = 4$ ;

25 - figure 4 illustrates: (A) Effect of the length of the hydrocarbon chain of the n-alkanols (along the x-axis) in the activation of  $^{125}$ I efflux (rate of efflux in  $\text{min}^{-1}$ , along the y-axis). (B) Effect of octan-2-ol on the activation of  $^{125}$ I efflux (rate of efflux in  $\text{min}^{-1}$ , along the y-axis);

30 - figure 5 illustrates the effect of octan-1-ol (1 mM) and of 18-alpha glycerrhetinic acid ( $\alpha$ -GA 10  $\mu$ M) on the calcium response induced by an ATP stimulation that involves intercellular communication;

35 - figure 6 illustrates the effect of cellular uncoupling in the activation of  $^{125}$ I efflux (% , along the y-axis) by application of 18-alpha glycerrhetinic acid ( $\alpha$ -GA 10 and 100  $\mu$ M) ( $n=12$ ), in comparison with the effect of octan-1-ol;

- figure 7 illustrates: (A) Effect of the inhibition of protein kinase A by H-89 (30  $\mu$ M, 30 min) on the activation of  $^{125}$ I efflux (rate of efflux in

min<sup>-1</sup>, along the y-axis) induced by octan-1-ol (1 mM), FSK (1 μM) or an octan-1-ol + FSK costimulation. (B) Effect of the inhibition of protein kinase C (GF109203X, 100 nM, 30 min) on the activation of <sup>125</sup>I efflux (rate of efflux in min<sup>-1</sup>, along the y-axis) induced by octan-1-ol (1 mM);

- figure 8 illustrates the effect of n-alkanols on the total intracellular cAMP level in comparison with the baseline level and with an FSK stimulation (5 μM);

- figure 9 illustrates: (A) Effect of octan-1-ol (1 mM) on iodide efflux (min<sup>-1</sup>) as a function of time (min) in human epithelial cells of bronchial origin, Calu-3, with (n=8) or without pretreatment with glibenclamide (100 μM, 1 hour) (n=8), and with (n=8) or without pretreatment with DIDS (500 μM, 1 hour) (n=8). The arrow represents the moment at which the octan-1-ol (1 mM) is added, with or without glibenclamide and with or without DIDS. (B) The maximum effect of octan-1-ol is normalized to 100%. Effect of the treatment with DIDS (500 μM, 1 hour) or glibenclamide (100 μM, 1 hour) on the maximum octan-1-ol response, the baseline level is indicated (t test: \*\*\* P < 0.001; ns: not significant). (C) Effect of increasing doses (along the x-axis) of octan-1-ol in the presence or absence of FSK (1 μM) on <sup>125</sup>I efflux (rate of efflux in min<sup>-1</sup>, along the y-axis) in Calu-3 cells. (D) Dose-response curve for octan-1-ol (n=8 for each concentration tested) in the presence or absence of FSK (1 μM), represented as % of the maximum activation obtained for 10 mM of octan-1-ol. The half-effect concentration (EC<sub>50</sub>) for octan-1-ol is 512 μM in the presence of FSK (1 μM) and 1.14 mM in the absence of FSK (1 μM);

- figure 10 illustrates: (A) Effect of octan-1-ol (1 mM) (n=8) or of a cocktail of drugs used to give maximum activation of the mutated CFTR-ΔF508 channel (10 μM FSK then 30 μM genistein (GST)) (n=8) on iodide efflux (min<sup>-1</sup>) as a function of time (min) in JME/CF15 human bronchial epithelial cells extracted from

patients suffering from cystic fibrosis. The arrow represents the moment at which the octan-1-ol (1 mM) or the 10  $\mu$ M FSK + 30  $\mu$ M GST are added. (B) Representation of the percentage activation of CFTR- $\Delta$ F508 obtained with octan-1-ol (1 mM) compared with the maximum activity obtained with the 10  $\mu$ M FSK + 30  $\mu$ M GST cocktail, which is normalized to 100% of the maximum response. (C) Effect of the pretreatment with glibenclamide (100  $\mu$ M, 1 hour) (n=8) or of the pretreatment with DIDS (500  $\mu$ M, 1 hour) (n=8) on the maximum response (normalized to 100% activation) obtained with 1 mM of octan-1-ol (t test: \*\*\* P < 0.001; ns: non significant);

- figure 11 illustrates the reversibility of the effect of octan-1-ol (1 mM) on the activation of CFTR studied by patch-clamp in the whole cell configuration in a CHO-BQ1 cell. Family of currents evoked in a CHO-BQ1 cell by successive depolarizations between -80 and +15 mV from a maintenance potential of -60 mV and by increments of 5 mV, in the absence (control) and in the presence of octan-1-ol (1 mM) and after washing of the octan-1-ol for 15 min with a physiological saline rinsing medium;

- figure 12 illustrates the structure of the C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> n-alkanols.

It should be understood, however, that these examples are given merely by way of illustration of the subject of the invention, of which they in no way constitute a limitation.

**Example: Demonstration of the properties of n-alkanols as CFTR openers or activators**

**1) Experimental methods**

**1.1) Cells in culture**

The studies on CFTR are, firstly, carried out on CHO cells (Chinese Hamster Ovary cells) that express the recombinant human CFTR protein (CHO-CFTR(+)) (Riordan et al., 1989). The cells are cultured at 37°C in an incubator saturated with water containing 5% CO<sub>2</sub>, in  $\alpha$ MEM medium supplemented with fetal calf serum

(7.5%), with 2 mM glutamine, with 50 IU/ml of penicillin and with 50 µg/ml of streptomycin. The cells that do not express CFTR are noted CHO-CFTR(-) and are cultured in DMEM/F12 medium under the same conditions as above.

The CFTR studies are also carried out on Calu-3 cells (ATCC No. HTB-55), which are human pulmonary epithelial cells endogenously expressing the CFTR channel. These cells are cultured under the same culture conditions as the CHO cells. The study of the mutated CFTR channel is carried out on JME/CF15 cells, which are epithelial cells extracted from respiratory airways of patients suffering from cystic fibrosis (homozygous ΔF508) (Jefferson et al., 1990). These cells therefore express the ΔF508 mutated CFTR channel. These cells are cultured under the same conditions as above, but the culture medium is supplemented with a hormone mixture containing: adenine (180 µM), insulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), hydrocortisone (1.1 µM), triiodothyronine (2 nM), epinephrine (5.5 µM), epidermal growth factor (1.64 nM).

#### 1.2 Patch-clamp technique applied to the study of cells in culture

The patch-clamp technique consists in applying a glass pipette or a glass microelectrode to the surface of the cell. By applying slight touch, it is possible to cause the membrane to adhere to the glass. A small piece of membrane (patch) is thus isolated at the end of the pipette. This is the principle of patch-clamp (O.P. Hamill et al., Pflügers Arch., 1981, 391, 85-100; R. Penner, A Practical Guide to Patch Clamping, 1995, In Single Channel Recording, 2nd edition (Eds. B. Sakmann et al.) Plenum Press, New York, 3-30). To do this, the patch-clamp pipette must have a tip of the order of 1 µm in diameter and a resistance of the order of 1-5 MΩ. The resistance of a pipette or of a microelectrode makes it possible to assess the fineness of the tip: the greater the resistance, the finer the tip or the more the electrode is blocked. The diameter

of the patch-clamp pipette does not make it possible to penetrate the cell but, on the other hand, it makes it possible effectively to trap a piece of membrane in the tip. Interactions between the membrane and the glass will form, aided by a slight suction or negative pressure in the pipette. The quality of this interaction (or sealing) is also assessed by measuring the resistance between the glass and the membrane. To measure overall currents in the whole cell configuration, a sealing resistance of 1 GΩ is sufficient.

In general, recordings of electric current through a patch containing, for example, a channel are measured. The imposed membrane potential ( $E_{\text{clamp}}$ ) is generally in millivolts. When the channel is closed, the current oscillates weakly around a baseline level (state C). This minute baseline current circulates in the "leaks" between the patch and the end of the pipette. When the channel opens (state O), the current jumps to another level, and then returns to the baseline level when the channel closes, and so on.

The measurements can be carried out in one of the following configurations: cell-attached, whole-cell, inside-out patch or outside-out patch.

The patch-clamp experiments are carried out on confluent cells.

More specifically, culture dishes (cell support) are placed in an experimentation cell (volume 1 ml) on the platform of an inverted microscope (Nikon) equipped with phase-contrast lighting. The whole-cell configuration is used for recording the cell currents (Hamill et al., 1981). The experiments are carried out at ambient temperature (20-22°C). The currents are amplified with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instrument Ltd) having a 2-5 kHz low-pass filter (Bessel 6-pole filter), and recorded on the hard disk of a PC after digitization at 10-25 kHz. The pipettes are produced from glass tubes 1 mm in diameter (Clark

Electromedical Instrument) in four steps with a horizontal drawing device (Bruhn Flaming 97, CA).

The pipettes, filled with an intracellular solution containing, in mM: 60 KCl; 80 NMDG (N-methyl-G-glucamine); 10 HEPES; 5 EGTA; 1 CaCl<sub>2</sub>; 4 MgATP; 0.2 Na<sub>3</sub>GTP; pH 7.4, titrated with KOH), having a resistance of 5 MΩ. The potentials are expressed as the difference between the potential of the patch electrode and that of the bath. In the whole-cell configuration, they represent the membrane potential of the cell. The junction potentials that form between the recording electrode and the extracellular medium are eliminated before the contact of the electrode with the cell. The chlorine current inversion potential is obtained from the Nernst equation ( $E_{rev} = (RT/F) \log ([Cl]_i/[Cl]_e)$ ); i and e are the intracellular and extracellular ion concentration, and R, T and F have their usual meaning. The current-voltage relationships in the stationary state are determined using slow voltage ramps (20 mV/.s) under an imposed voltage condition.

The extracellular recording solution consists of (in mM): 110 NaCl; 23 NaHCO<sub>3</sub>; 3 KCl; 1.2 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 5 HEPES; 11 D-glucose; gassed with 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>; pH 7.4.

### 1.3) Measurement of radioactive tracer fluxes applied to the study of epithelial cells in culture

Since the CFTR channel is permeable to halides (Br<sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>I<sup>-</sup>>F<sup>-</sup>), the measurement of <sup>125</sup>I radioactive iodide efflux proved to be an effective technique for measuring the activity of the CFTR channel (Chang et al., 1998). This technique makes it possible to follow the kinetics of exit of the <sup>125</sup>I radioactive iodide. The cells are cultured in 24-well plates with a dilution to 1/10 after passage. On the fourth day of culture, the drugs to be tested are dissolved in solution according to the desired concentration, at 37°C, in medium B, at pH 7.4, containing, in mM: 137 NaCl, 5.36 KCl, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.5 glucose and 10 HEPES-NaOH. The wells are washed 4 times with 500 µl of medium B. The

solution is subsequently replaced with 500  $\mu$ l of loading solution containing 1  $\mu$ M KI and 0.5  $\mu$ Ci of  $^{125}$ I Na/ml for 30 min. The kinetics of exit of  $^{125}$ I are determined after having eliminated the loading solution and washed the wells 4 times with 500  $\mu$ l of medium B. For the  $^{125}$ I exit kinetics, 500  $\mu$ l of medium B containing or not containing the molecules to be tested are incubated for 30 sec in the wells and recovered in a hemolysis tube, so as to be replaced with 500  $\mu$ l of medium B containing or not containing the molecules to be tested. The operation is repeated every 30 s for 2 to 6 min. At the end of the efflux, the intracellular ions are extracted by adding 1 ml of trichloroacetic acid (7.5%) to the cell layer. All the samples are counted in a gamma counter (Kontron). The precipitated proteins are solubilized in 0.1N NaOH and quantified using a colorimetric test.

#### 1.4) Data analysis

The tracer contained in the cell layer at the beginning of the efflux is calculated as the sum of the samples and of the extracts counted. The efflux curves are constructed by expressing the percentage of the content remaining in the cell layer (I%) with respect to time. The stimulated or nonstimulated efflux rate constants ( $k$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) are determined by smoothing the efflux curves to a monoexponential function  $I\% = 100 \cdot \exp(-kt)$  using a linear regression of the neperian logarithm of the data,  $k$  is used to calculate the iodide released into the medium with respect to time. The hypothesis is made that, in the presence of a stimulator, the efflux is the sum of two iodide effluxes occurring in parallel: a basal efflux and a stimulated efflux characterized, respectively, by the constants  $k_b$  and  $k_s$ . The total net efflux is then described by the equation  $I_t\% = 100 \cdot (1 - \exp(-k_t t))$  where  $k_t$  is the sum of  $k_b$  and  $k_s$ . Finally,  $k_s$  calculated as  $k_t - k_b$  is used to establish a dose-response relationship for antagonists. The data is expressed as means  $\pm$  SD, and the t-test is used to determine the significances.



The concentration-response curves for agonists or for antagonists are smooth using the hyperbolic equation  $Y = Y_{\max} * X / (EC_{50} + X)$ , where Y is the response. Y begins at the basal level and progresses to the plateau ( $Y_{\max}$ ), X is the concentration and the half-effect values (EC are calculated using GraphPad Prism v3.0 (GraphPad software)).

#### 1.5) Assaying of total intracellular cAMP

The CHO cells are cultured for four days in a 24-well culture plate. On the fourth day of culture, each well is rinsed twice with 500  $\mu$ l of medium B, and 500  $\mu$ l of this buffer containing the molecule to be tested are added to each well. After incubation at 37°C for 5 min, the reaction is stopped by adding a cell lysis buffer. The cell lysis is verified with Trypan blue. The amount of cAMP contained in the cells is determined using the Enzyme Immuno Assay kit (Amersham Biotechnology). The cAMP level is expressed in pmol/well  $\pm$  SD.

#### 1.6) Cell imaging and measurement of intracellular $Ca^{2+}$ concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ )

The  $Ca^{2+}$  measurements are carried out in the presence of fura-2 (impermeant fluorescent probe) which binds  $Ca^{2+}$ . The cells are incubated in serum-free DMEM/F12 culture medium in the presence of the permeant form of fura-2 (fura-2/AM, 2.5  $\mu$ M) for 1 h at 37°C. The cells, placed on the platform of an epifluorescent microscope (Olympus) (20X objective), are perfused with the solutions to be tested (e.g. ATP, octanol). They are sequentially illuminated at 340 nm and 380 nm and the fluorescence emitted (F) is measured at 510 nm. It is detected via a 12-bit CCD camera (Sony) connected to a data processing computer unit (TILL Photonics). The intracellular  $Ca^{2+}$  concentration  $[Ca^{2+}]_i$  is calculated using the Grynkiewicz equation (Grynkiewicz et al., 1985):  $[Ca^{2+}]_i = K_d * (R - R_{\min} / R_{\max} - R)$ , based on the ratiometric analysis R (340/380 nm) of the fluorescence (TILL Vision);  $R_{\max}$  and  $R_{\min}$  denote the ratio of fluorescence measured in the presence or in the absence of  $Ca^{2+}$ .

## 2) Results

The n-alkanol concentrations used range from 0.1 to 10 mM. These concentrations represent final proportions (v/v) of from 0.001% (for 0.1 mM of alcohols) to a maximum of 0.1% (for 10 mM of alcohols).

### 2.1) *Octanol specifically activates the CFTR channel*

The molecules tested are n-alkanols, and in particular octan-1-ol, which were tested for their ability to activate the CFTR channel.

The screening of the molecules as CFTR channel openers was carried out by measuring their effect on  $^{125}\text{I}$  radioactive iodide efflux and on transmembrane chloride currents. These data were supplemented by measurement of the intracellular cyclic AMP (cAMP) level and of variations thereof in various experimental situations.

Evaluation of the effect of CFTR activation by the n-alkanols is first of all carried out on the CHO-CFTR(+) cell line. CHO-CFTR(-) cells that do not express the CFTR protein were used as control cells. A23187 (2  $\mu\text{M}$ ) (a calcium ionophore) has no effect on  $^{125}\text{I}$  efflux, both in CHO-CFTR(+) and CHO-CFTR(-) cells, showing that there are no intracellular calcium-dependent  $\text{Cl}^-$  channels (Chappe et al., 1998). Since the CFTR channel is mainly regulated by protein kinases A, the control experiments made use of FSK for stimulating the intracellular cAMP level.

Figure 1A shows an activation of CFTR obtained by application either of 1  $\mu\text{M}$  of FSK (FSK) or of octan-1-ol (1 mM) or a combined application of FSK (1  $\mu\text{M}$ ) and of octan-1-ol (1 mM) to CHO-CFTR(+) cells. The activation of the CFTR channel, measured by the  $^{125}\text{I}$  efflux, induces an increase in the amplitude of the iodide efflux (expressed as % of  $^{125}\text{I}$  released into the medium) and in the rate of exit of  $^{125}\text{I}$ .

In figure 1B, the control experiments for evaluating the specificity of the molecules tested on the activity of the CFTR channel were carried out on

CHO-CFTR(-) cells, in the presence or absence of activators (1  $\mu$ M FSK, 1 mM octan-1-ol). In these CHO-CFTR(-) cells, octan-1-ol (0.1 to 5 mM) and FSK (5  $\mu$ M) do not significantly modify the basal level of  $^{125}$ I efflux (figure 1C).

The activating effect of octan-1-ol and also of FSK (1  $\mu$ M) or of a combined application of FSK and octan-1-ol on CFTR is completely inhibited by the addition of glibenclamide (100  $\mu$ M), which is commonly used to specifically inhibit the CFTR channel (figure 1D). These results confirm the specificity of octan-1-ol on the activity of CFTR.

The CHO-CFTR(+) cells are subsequently stimulated with increasing concentrations of FSK or of octan-1-ol, and the  $^{125}$ I efflux rate constants are measured. Figure 2 represents a dose-response curve for octan-1-ol (0.1 to 5 mM) or for FSK (0.1 to 5  $\mu$ M) on the activation of CFTR. It can be seen in fig. 2 that the activation of CFTR by FSK or by octan-1-ol is dependent on the concentration, with an  $EC_{50}$  of approximately 0.5  $\mu$ M for FSK and of 0.5 mM for octan-1-ol. The effects of octan-1-ol on the activation of CFTR can be observed for octan-1-ol concentrations of 0.3 mM to 5 mM, with a plateau reached at 1 mM and a half-activation dose of 0.5 mM.

Similarly, the activation of CFTR by FSK or octan-1-ol is observed by a patch-clamp in the whole-cell configuration. Figures 3A and 3B show, respectively, that FSK (1  $\mu$ M) and octan-1-ol (1 mM) produce an approximately 10-fold increase in membrane conductance compared with the control. The reversion potential of the FSK- or octan-1-ol-induced current is  $1 \pm 0.6$  mV, showing that  $Cl^-$  is the main ion that contributes to this current. This FSK- or octan-1-ol-induced current is completely inhibited by the application of glibenclamide, showing that it is indeed the CFTR channel that is involved in the current induced either by FSK or by octan-1-ol. Figure 3B shows that application of octan-1-ol alone (1 mM), i.e.

without FSK, induces a full activation of the CFTR channel.

2.2) *Octan-1-ol specifically stimulates the CFTR channel in human bronchial epithelial cells*

5 (Calu-3)

The ability of octan-1-ol to stimulate CFTR in a human bronchial epithelial cell line (Calu-3) was also tested. As shown in figure 9A, octan-1-ol activates the exit of iodide in Calu-3 cells. This  
10 octan-1-ol-activated efflux is strongly blocked by treatment (1 hour) with glibenclamide (100  $\mu$ M), a CFTR channel inhibitor, whereas treatment (1 hour) with 500  $\mu$ M of DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid), used to block  $\text{Cl}^-$  channels except the  
15 CFTR channel which is insensitive thereto, has no effect (figure 9B). All these results show that octan-1-ol specifically activates the human CFTR channel endogenously expressed in Calu-3 human bronchial epithelial cells. Furthermore, as observed in the CHO-CFTR(+) cells (see figure 1), octan-1-ol activates the  
20 human CFTR channel in a dose-dependent manner (0.1 to 10 mM) in Calu-3 cells (figures 9C and D). Finally, a dose-response curve for octan-1-ol produced in the presence of FSK (1  $\mu$ M) shifts to the left the dose-  
25 response curve for octan-1-ol, indicating a potentiation by forskolin of the activation of CFTR by octan-1-ol. In addition, the activation of the CFTR channel by octan-1-ol for concentrations greater than 0.5 mM is greater than that obtained with FSK (1  $\mu$ M),  
30 since octan-1-ol potentiates the activity of the CFTR channel stimulated by FSK (1  $\mu$ M) (Figures 9C and D).

2.3) *Octan-1-ol specifically activates the  $\Delta$ F508 mutated CFTR channel in epithelial cells of pulmonary origin (CF15) from  $\Delta$ F508 homozygous patients*  
35 *suffering from cystic fibrosis*

The ability of octan-1-ol to activate the  $\Delta$ F508 mutated CFTR channel was tested. The  $\Delta$ F508 mutation is found in more than 70% of patients suffering from cystic fibrosis. A large majority of the  $\Delta$ F508 mutated

CFTR channel is degraded by the ubiquitin-proteasome system inside the cell, and only a very small amount of mutated channel reaches the surface of the membrane, where it can be activated. JME/CF15 human bronchial epithelial cells extracted from patients suffering from cystic fibrosis and homozygotes for the  $\Delta F508$  mutation were used. The MPB-91 molecule, known to target a certain number of CFTR- $\Delta F508$  channels to the plasma membrane (Dormer et al., 2001), was also used. The  $\Delta F508$  mutated CFTR channels, present at the plasma membrane, were stimulated with octan-1-ol (1 mM). Figure 10A shows that octan-1-ol specifically activates the  $\Delta F508$  mutated CFTR channel. A cocktail of stimulators (10  $\mu M$  FSK + 30  $\mu M$  genistein) makes it possible to obtain the maximum activity for the mutated CFTR- $\Delta F508$  channel. Octan-1-ol (1 mM) is capable, by itself, of activating approximately 50% of the maximum activity of the mutated CFTR- $\Delta F508$  channel (figure 10B). This CFTR- $\Delta F508$  activation is inhibited by glibenclamide (100  $\mu M$ ) whereas it is insensitive to DIDS (500  $\mu M$ ) (figure 10C), demonstrating that octan-1-ol specifically stimulates the  $\Delta F508$  mutated CFTR channel. Furthermore, octan-1-ol has no effect on the basal level, when the mutated channel is not present at the plasma membrane, showing that it does not activate other chloride conductances and that it is indeed specific for the CFTR channel. All these results demonstrate that octan-1-ol is capable of activating the  $\Delta F508$  mutated CFTR channel in human pulmonary epithelial cells from patients suffering from cystic fibrosis. Octan-1-ol is thus of great interest for envisioning a pharmacotherapeutic treatment for cystic fibrosis.

#### 2.4) The activating effect of octan-1-ol on CFTR is reversible

Finally, we examined, by means of the whole-cell configuration patch-clamp technique on CHO-BQ1 cells that express the human CFTR channel, whether the effect of octan-1-ol (1 mM) on CFTR channels was

reversible. As indicated in figure 11, it is seen that octan-1-ol (1 mM) brings about an increase in current due to the activation of CFTR. After washing of octan-1-ol (1 mM) with a physiological saline solution for 5 15 min, the CFTR channel activation disappears, indicating that the activating effect of octan-1-ol on CFTR is reversible.

2.5) Long ( $C_6$  to  $C_{10}$ ) hydrocarbon-chain  
10 *n*-alkanols activate the CFTR channel (see figure 12 for the structure of the *n*-alkanols)

The effect of *n*-alkanols other than octan-1-ol on the activation of CFTR was also tested. Figure 4A shows that the use of *n*-alkanols having hydrocarbon  
15 chain lengths greater than or equal to those of hexan-1-ol ( $C_6$ ) up to decan-1-ol ( $C_{10}$ ) significantly activates the CFTR channel. The activation of CFTR increases as a function of the length of the hydrocarbon chain (i.e. as a function of the  
20 hydrophobicity) of the alcohol. Figure 4 shows an increase in activation of CFTR following the application of hexan-1-ol ( $C_6$ ), of heptan-1-ol ( $C_7$ ), of octan-1-ol ( $C_8$ ), of decan-1-ol ( $C_{10}$ ). For *n*-alkanols having short hydrocarbon chains (methanol, butan-1-ol),  
25 the  $^{125}\text{I}$  efflux is not significantly different from the unstimulated efflux, indicating that ethanol and butanol do not activate the CFTR channel.

In figure 4B, it can be seen that octan-2-ol also activates the CFTR protein. This shows that the  
30 position of the OH radical on the molecule in the 1-position or 2-position is not essential for activation of the CFTR channel.

2.6) The activation of CFTR by *n*-alkanols is not due to cellular uncoupling

35 Octanol and the other *n*-alkanols can modify cellular uncoupling due to gap junctions. Such uncoupling is demonstrated in CHO cells, by measuring the calcium response induced by application of ATP. To do this, a molecule completely different from

n-alkanols but known to uncouple cells, 18-alpha glycerrhetinic acid ( $\alpha$ -GA), was used. Figures 5A-C show that the application of  $\alpha$ -GA (10 to 100  $\mu$ M) or else octan-1-ol (1 mM) clearly uncouples the cells, as shown  
5 by the ATP-induced calcium response. However, no effect of ( $\alpha$ -GA) on the activity of the CFTR channel is observed (fig. 6). The activation of CFTR by n-alkanols is not therefore due to their cellular uncoupling property.

10           2.7) *Protein kinase A activity is required for CFTR activation by octan-1-ol*

Phosphorylation of the CFTR channel, in particular by protein kinase A (PKA), has been shown to be required for the function and the activation of the  
15 channel. The activation of the CFTR channel by the n-alkanols is inhibited by treatment with H-89 (30  $\mu$ M), used to inhibit PKAs (figure 5A), which shows that constitutive phosphorylation of the CFTR channel is required for its activation by octan-1-ol.

20           Recent studies have shown that phosphorylation of CFTR by protein kinase C (PKC) could be a prerequisite for CFTR activation. Octanol has been shown to be capable of activating certain PKC subtypes. A powerful inhibitor of PKCs in the presence of octan-  
25 1-ol was therefore used. Under these conditions, the activation of CFTR by octan-1-ol is not inhibited (figure 7). These results show that octan-1-ol clearly activates CFTR via a PKC-independent mechanism.

30           Octanol and n-alkanols can interact directly with the CFTR channel at the hydrophobic sites of the protein, in order to induce a conformational modification favorable to its activation.

35           The n-alkanols do not induce any increase in cAMP, and the activation of CFTR by the n-alkanols is not therefore due to an increase in the cAMP level induced by the n-alkanols.

          The literature indicates that long-chain n-alkanols are not potential activators of adenylate cyclase and therefore of the intracellular cAMP level,

but would rather have an inhibitory effect. Figure 8 gives the intracellular cAMP level in the CHO-CFTR(+) cell, measured after 5 min in the presence of 5  $\mu$ M or 1  $\mu$ M of FSK (activator of the enzyme for cAMP synthesis; adenylate cyclase), or of 1 mM of octan-1-ol, of hexan-1-ol or of ethanol. While 1  $\mu$ M or 5  $\mu$ M FSK significantly increases the cAMP level, neither octan-1-ol, hexan-1-ol or ethanol modifies the basal cAMP level. When applied alone, octan-1-ol triggers activation of the CFTR channel without increasing the cAMP level. These results show that octanol and the other C<sub>6</sub> to C<sub>10</sub> long-hydrocarbon-chain n-alkanols stimulate the CFTR channel via a cAMP-pathway-independent pathway.

15

Bibliographic references

Becq et al., (1994). *PNAS* 91: 9160-9164

Becq et al., (1999). *J. Biol. Chem.* 274: 27415-27425

Chang et al., (1998). *Methods Enzymol.* 92: 616-629

Cutting et al., (1990). *Nature.* 346: 366-369

Dalemans et al., (1991). *Nature.* 354: 526-528

Dormer et al., (2001), *J. Cell Sci.*, 114: 4073-4081

Drumm et al., (1991). *Science.* 254:1797-1799

Eidelman et al., (1992). *PNAS* 89: 5562-5566

Gregory et al., (1991). *Mol. Cell. Bio* 11: 3886-3893

Gribkoff et al., (1994). *J. Biol. Chem.* 269: 10983-10986



- Griesenbach et al., (1999). *Thorax*. 54: S19-S23
- Hamill et al., (1981). *Pflugers Arch*. 391: 85-100
- Marzalec et al., (1994). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 157-163
- Mascia et al., (2000). *PNAS* 97: 9305-9310
- Miller & Dallas, (1973). *Arch. Intern. Med.* 131: 148-155
- Nakahiro et al., (1991). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 235-240
- Narahashi et al., (1998). *Toxicol letter*. 100-101: 185-191
- Reddy et al, (1999). *Nature*. 402: 301-304
- Riordan et al., (1989). *Science*. 245: 1066-1073
- Sakihara et al., (2002). *Anesthesiology*. 96: 428-437
- Schwiebert et al., (1995). *Cell*. 81: 1063-1073
- Sheppard et al., (1993). *Nature*. 362: 160-164
- Tabcharani et al., (1991). *Nature*. 352: 628-631
- Tsui & Buchwald, (1991). *Advances in human genetic* 20: 153-266
- Wei et al., (1999) *Pflügers Arch*. 438: 635-641
- Weingart & Bukauskas, (1998). *Pflügers Arch*. 435: 310-319

**CLAIMS**

1. The use of C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> linear, possibly branched,  
or cyclic hydrocarbon-chain n-alkanols, for preparing a  
5 medicinal product for use in the treatment of pathology  
related to CFTR chloride channel disorders in humans or  
animals.

2. The use as claimed in claim 1, characterized  
10 in that said n-alkanols are linear, possibly branched,  
hydrocarbon-chain n-alkanols in which the OH group is  
in the 1-position (primary alcohol) or in the  
2-position (secondary alcohol).

3. The use as claimed in claim 1, characterized  
15 in that said n-alkanols are cyclic hydrocarbon-chain  
n-alkanols carrying one or more alcohol groups.

4. The use as claimed in any one of claims 1 to  
20 4, characterized in that said pathologies are selected  
from the group consisting of cystic fibrosis, atypical  
cystic fibrosis, and obstructions of the bronchial  
tracts or of the digestive tracts.

5. The use as claimed in any one of claim s 1  
25 to 5, characterized in that said n-alkanols are  
provided in a form suitable for intranasal or buccal  
administration.

6. The use as claimed in claim 5, characterized  
30 in that said n-alkanols are provided in a liquid form,  
for administration in the form of an aerosol or in the  
form of a nebulized material.

7. The use as claimed in claim 6, characterized  
35 in that said n-alkanols are combined with at least one  
pharmaceutically acceptable carrier appropriate for  
said intranasal or buccal administration.

8. The use as claimed in any one of claims 1 to 7, characterized in that said n-alkanols are administered at a concentration of between 0.001% and 0.1% (v/v), corresponding to a value of between 10 and 1000 ppm (parts per million), i.e. from 10 mg/kg to 1 g/kg.

**CLAIMS**

1. The use of C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> linear, possibly branched,  
or cyclic hydrocarbon-chain n-alkanols, for preparing a  
5 medicinal product for use in the treatment of pathology  
related to CFTR chloride channel disorders in humans or  
animals.

2. The use as claimed in claim 1, characterized  
10 in that said n-alkanols are linear, possibly branched,  
hydrocarbon-chain n-alkanols in which the OH group is  
in the 1-position (primary alcohol) or in the  
2-position (secondary alcohol).

3. The use as claimed in claim 1, characterized  
15 in that said n-alkanols are cyclic hydrocarbon-chain  
n-alkanols carrying one or more alcohol groups.

4. The use as claimed in any one of claims 1 to  
20 3, characterized in that said pathologies are selected  
from the group consisting of cystic fibrosis, atypical  
cystic fibrosis, and obstructions of the bronchial  
tracts or of the digestive tracts.

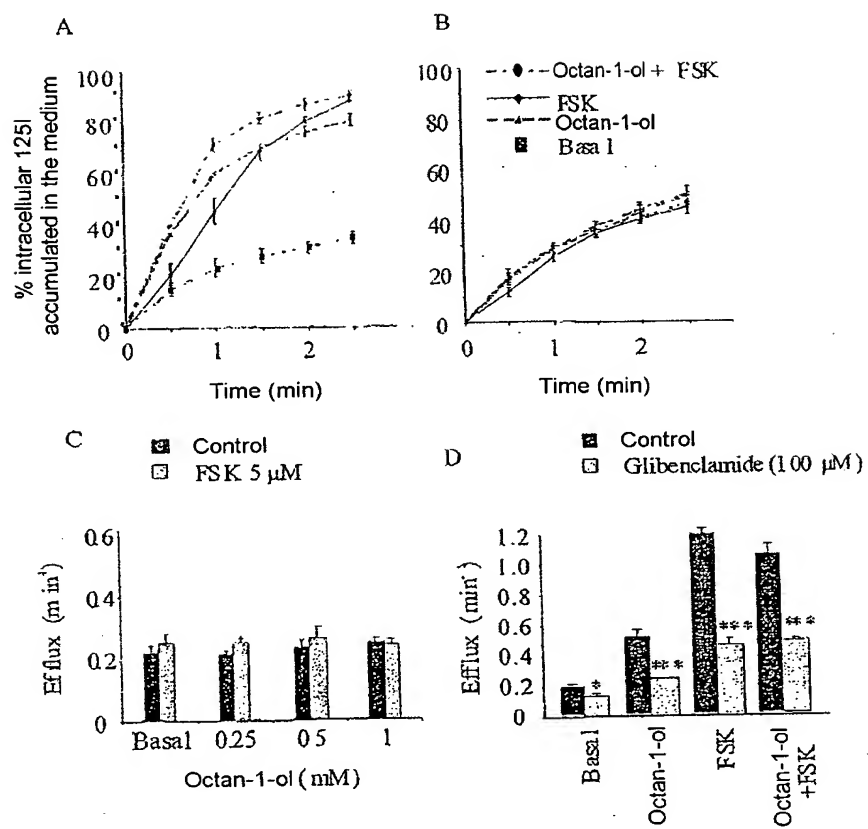
5. The use as claimed in any one of claims 1 to  
25 4, characterized in that said n-alkanols are provided  
in a form suitable for intranasal or buccal  
administration.

6. The use as claimed in claim 5, characterized  
30 in that said n-alkanols are provided in a liquid form,  
for administration in the form of an aerosol or in the  
form of a nebulized material.

7. The use as claimed in claim 6, characterized  
35 in that said n-alkanols are combined with at least one  
pharmaceutically acceptable carrier appropriate for  
said intranasal or buccal administration.

8. The use as claimed in any one of claims 1 to  
7, characterized in that said n-alkanols are  
administered at a concentration of between 0.001% and  
0.1% (v/v), corresponding to a value of between 10 and  
5 1000 ppm (parts per million), i.e. from 10 mg/kg to  
1 g/kg.

FIGURE 1



2/11

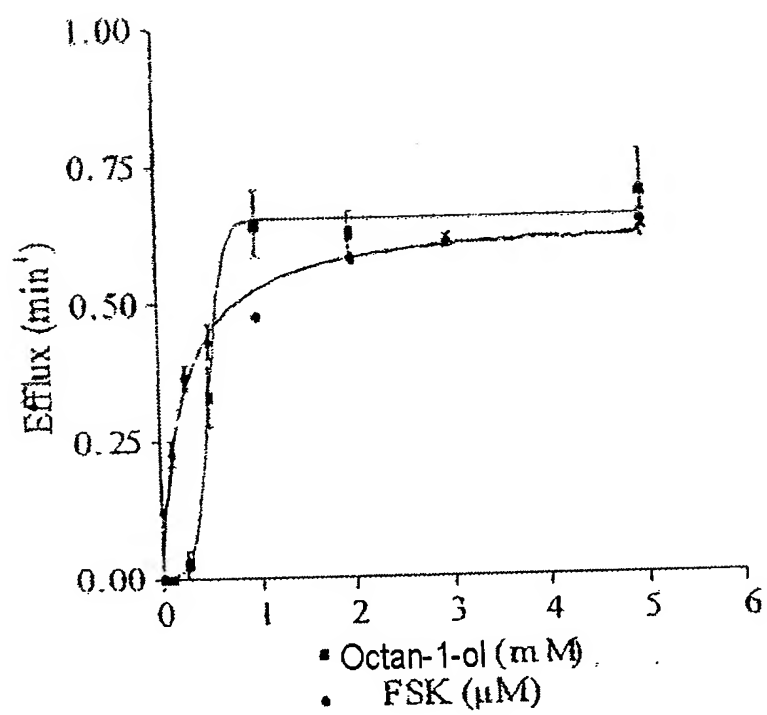


FIGURE 2

3/11

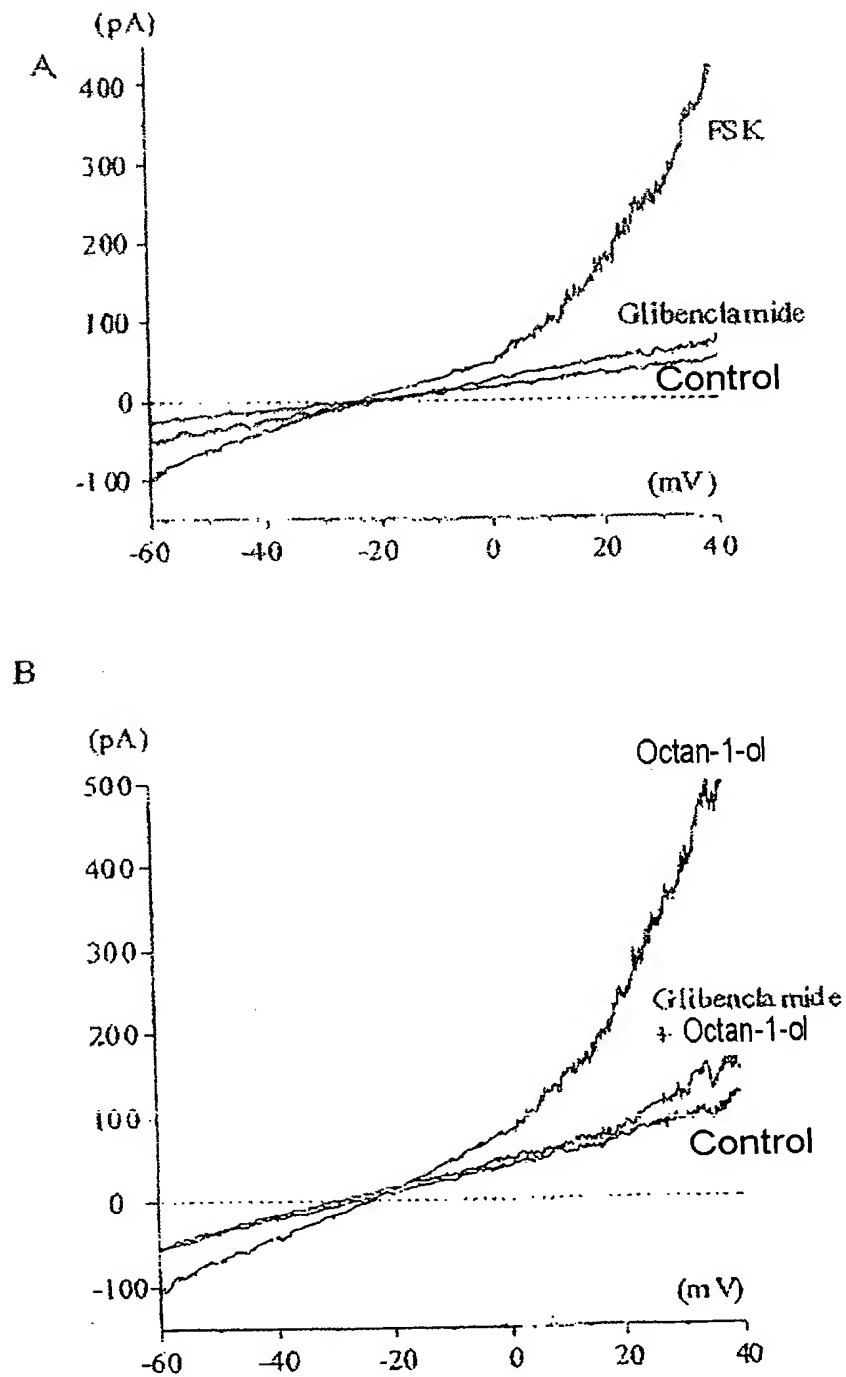


FIGURE 3



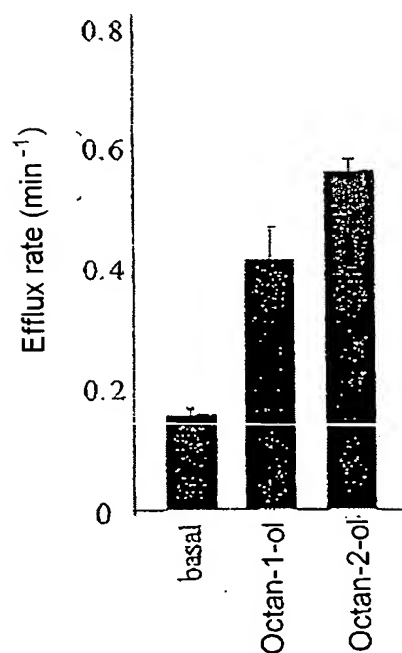
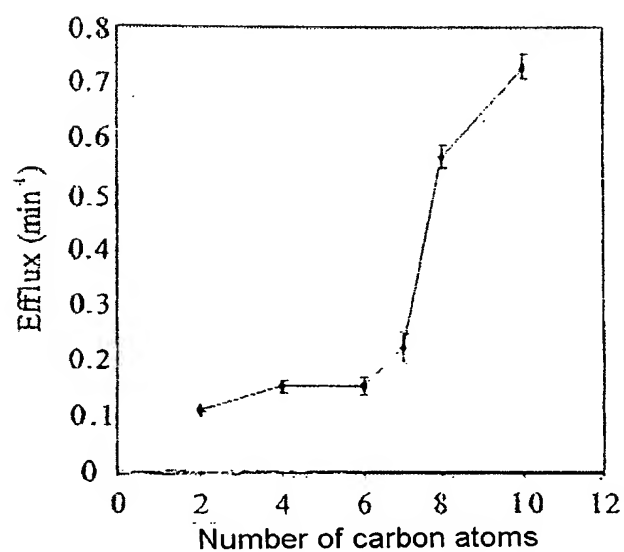


FIGURE 4

5/11

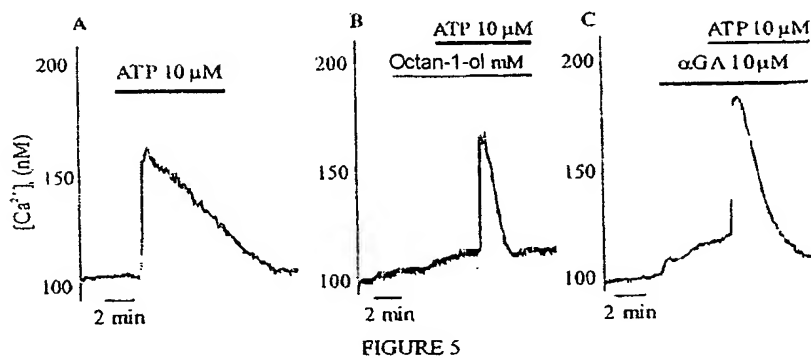


FIGURE 5

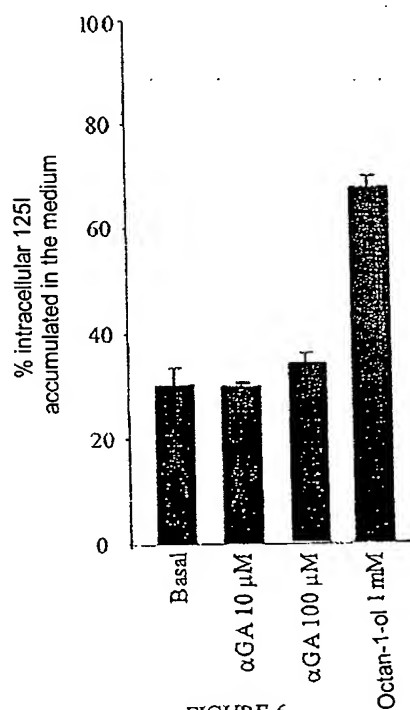


FIGURE 6

1<sup>st</sup> filing

6/11

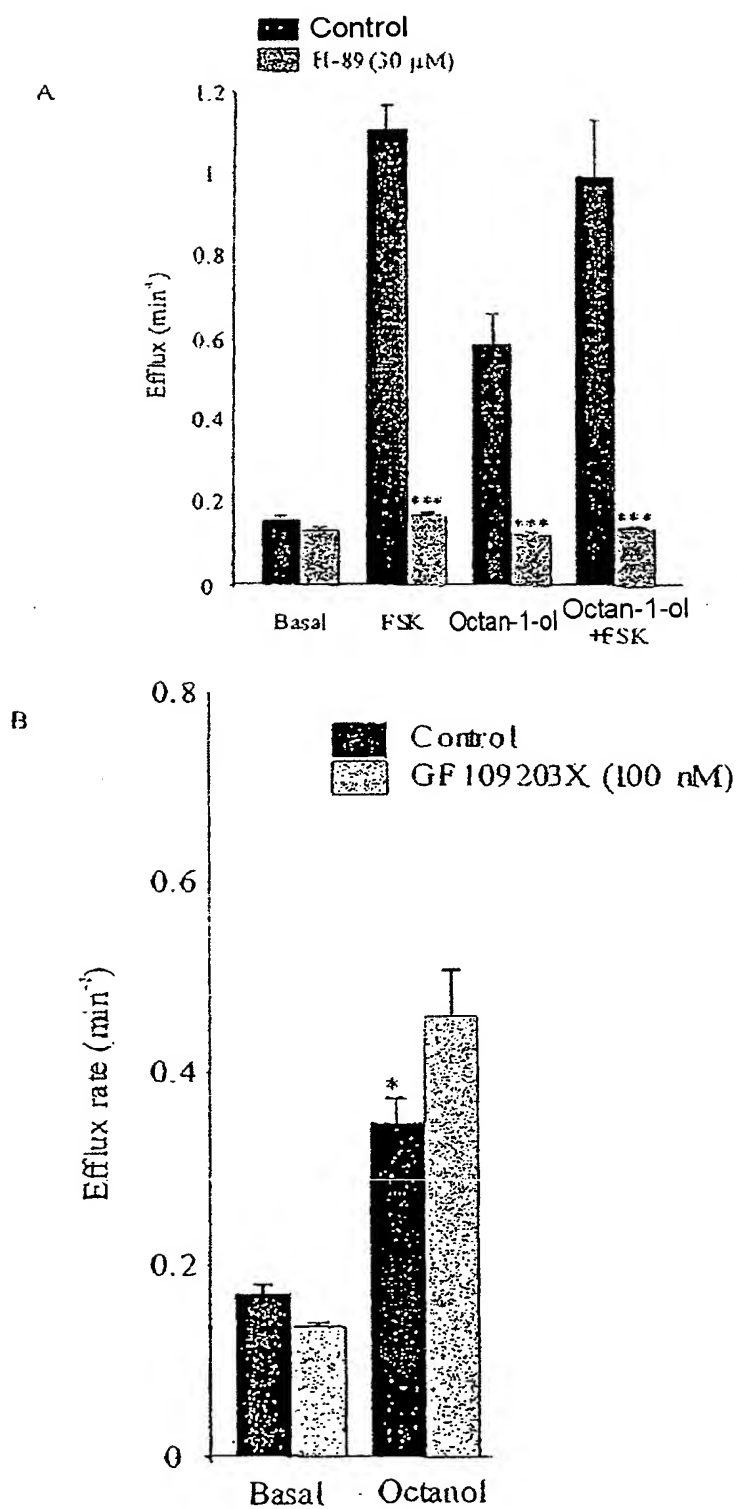


FIGURE 7 .

1<sup>st</sup> filing

7/11

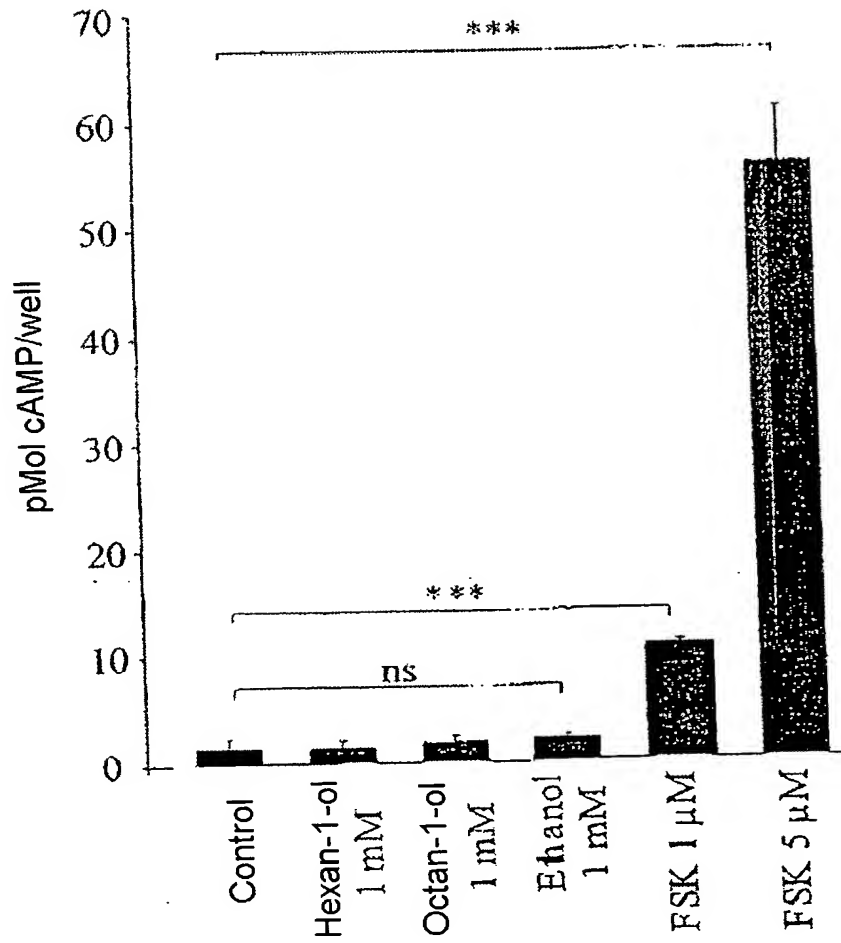


FIGURE 8

8/11

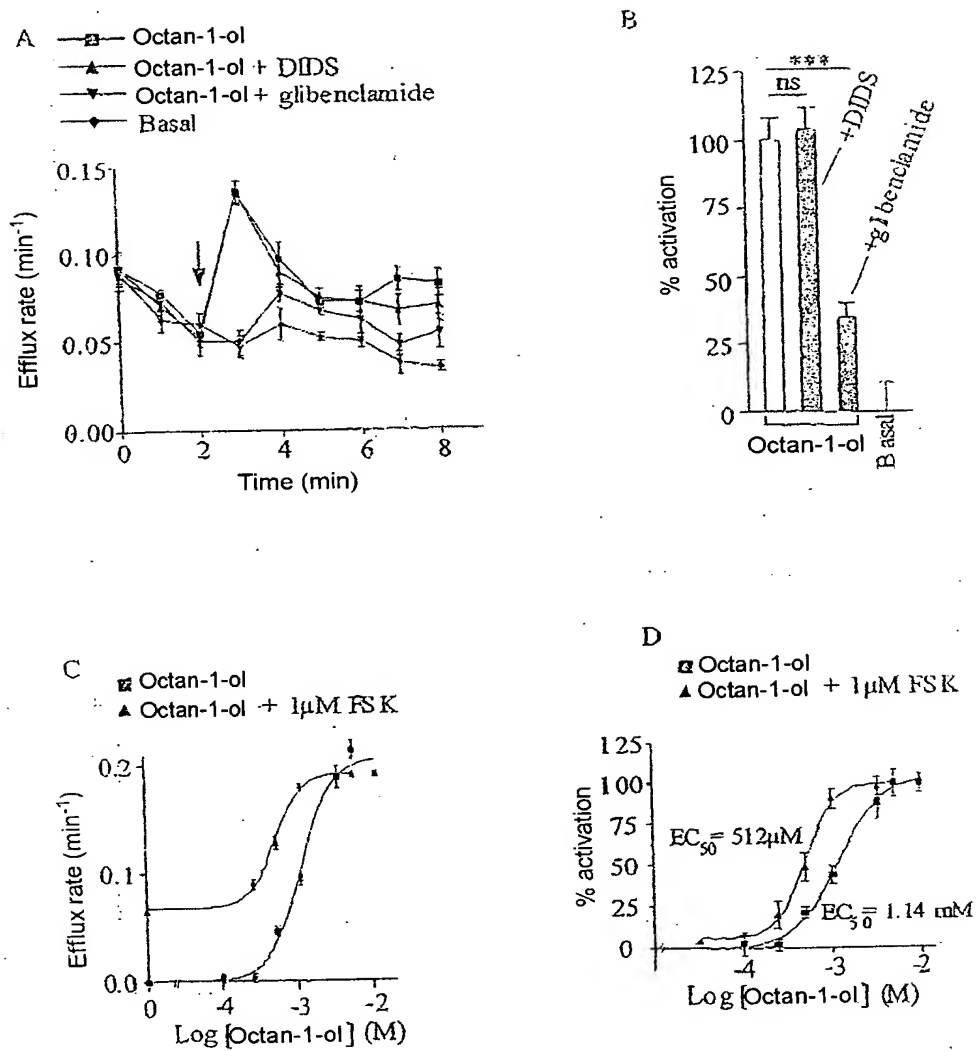


FIGURE 9

1<sup>st</sup> filing

9/11

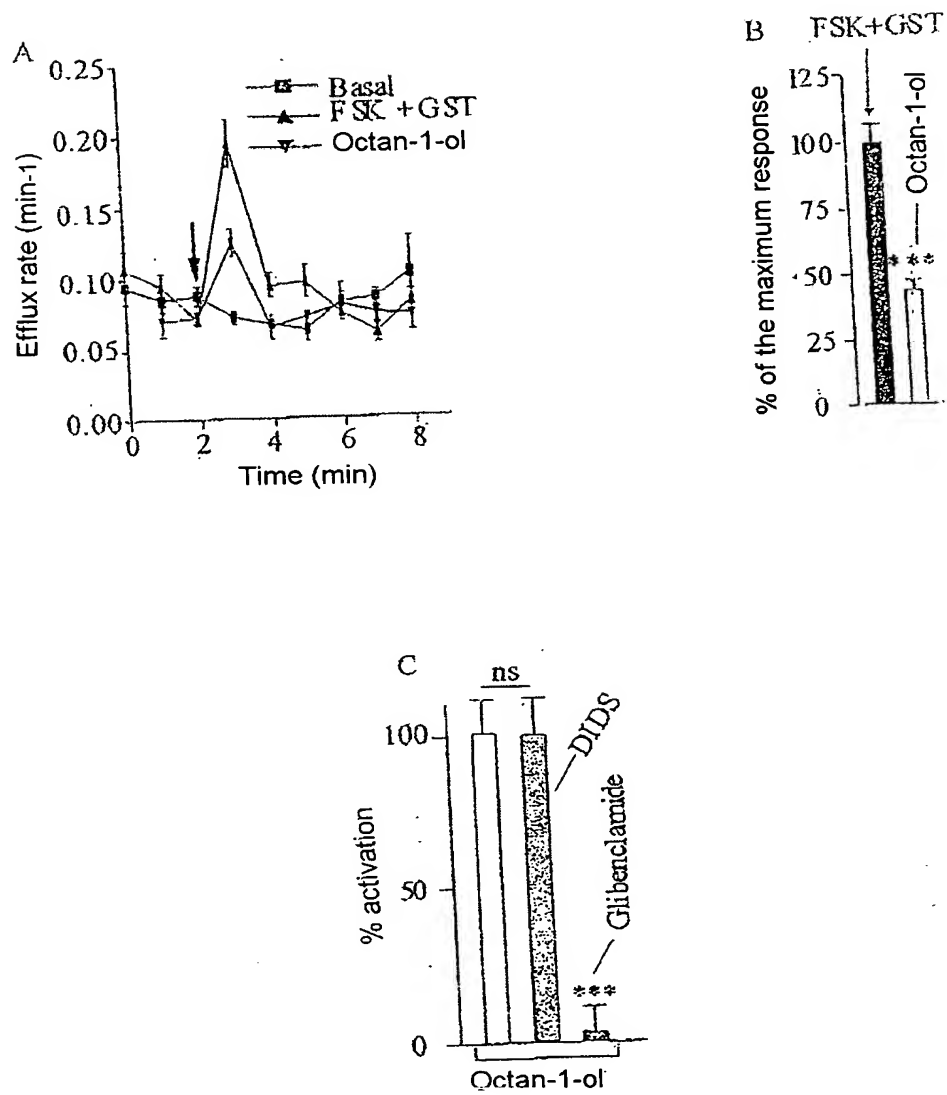


FIGURE 10

1<sup>st</sup> filing

10/11

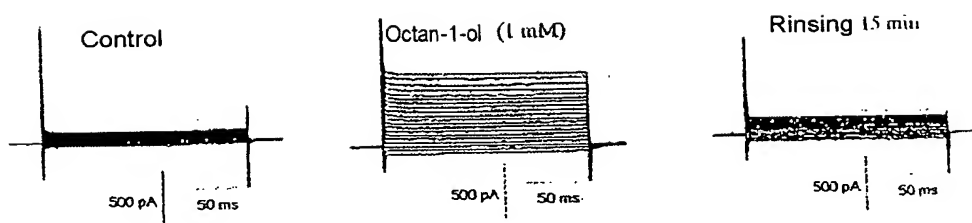


FIGURE 11.

Ethanol :  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Butan-1-ol :  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

Hexan-1-ol :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{OH}$

Heptan-1-ol :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{OH}$

Octan-1-ol :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{OH}$

Decan-1-ol :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{OH}$

Octan-2-ol :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{CH}_3$

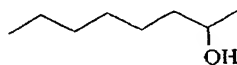
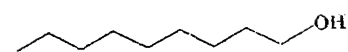
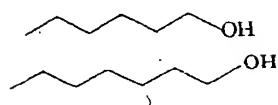
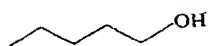


FIGURE 12



Received on July 25th, 2003

1<sup>st</sup> filing

**INPI**

Institut National de  
la Propriété Industrielle  
PATENTS DEPARTMENT

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 PARIS Cedex 08

Telephone : 33(1) 53 04 53 04 Telefax : 33(1) 42 94 86 54

**PATENT**

**UTILITY CERTIFICATE**

Intellectual Property Code – Book VI

**Cerfa**

No. 11235\*03

**DESIGNATION OF THE INVENTOR(S)** Page No.1/1 **INV**

(if the applicant is not the inventor or the sole inventor)

This form is to be completed in black ink and in block capitals

<b>Correspondent's references (optional)</b>	BLOcp644/107FR
<b>NATIONAL REGISTRATION No.</b>	03 08064
<b>TITLE OF THE INVENTION (maximum 200 characters)</b> USE OF N-ALKANOLS AS ACTIVATORS OF THE CFTR CHANNEL.	
<b>APPLICANT(S) :</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
<b>DESIGNATE(S) AS INVENTOR(S) :</b>	
<b>1 - Name</b>	VERRIER
<b>First names</b>	Bernard
<b>Address</b>	<b>Street</b> 262 quartier la Roumiguère
	<b>Postal code and city</b> 13360 ROQUEVAIRE
<b>Company name (optional) :</b>	
<b>2 - Name</b>	MARCET
<b>First names</b>	Brice
<b>Address</b>	<b>Street</b> Résidence les hauts de Mazarguesn Bâtiment B2
	40 bd du Vaisseau
	<b>Postal code and city</b> 13009 MARSEILLE
<b>Company name (optional) :</b>	
<b>3 - Name</b>	DELMAS
<b>First names</b>	Patrick
<b>Address</b>	<b>Street</b> IFR Jean Roche
	Boulevard Pierre Dramard
	<b>Postal code and city</b> 13916 MARSEILLE
<b>Company name (optional) :</b>	
<b>DATE AND SIGNATURE(S) OF THE APPLICANT(S) OR OF THE REPRESENTATIVE (Name and capacity of the signatory)</b>  July 2 <sup>nd</sup> , 2003,  (signature) Béatrice ORES (n°92-4046)	